



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**FUNCIONES CATALÍTICAS DE LAS OXIDASAS  
DE GIBERELINAS EN *FUSARIUM KONZUM***

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIOQUÍMICO**

**IVÁN ALEXIS PONCE LÓPEZ**

**PROFESOR**

**PATROCINANTE**

Dra. Lorena García N.  
Departamento de Bioquímica  
y Biología Molecular  
Facultad de Cs. Qcas. y Farm.  
Universidad de Chile.

**DIRECTOR DE MEMORIA**

Dra. María Cecilia Rojas G.  
Departamento de Química  
Facultad de Ciencias  
Universidad de Chile.

Santiago, 2008

**Trabajo financiado por el proyecto FONDECYT 1061127**

*Dedicado a la memoria de mi padre,  
fuente inagotable de cariño, inspiración y  
valores.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres, Mario y Erasma, y a mi hermana, Tania, por brindarme su cariño y apoyo en todo momento, dándome las fuerzas necesarias para alcanzar mis metas.

A Nicole y a mi hijo Alonso, por haber llenado mi vida de amor y alegría, motivándome día a día a seguir adelante.

A la Doctora Maria Cecilia Rojas, por su comprensión, paciencia y continuo apoyo, lo que permitió la realización de esta memoria, enseñándome además que la docencia va mucho más allá de la sala de clases.

A mis compañeros de laboratorio, Paula, Ximena, Claudia, Patricia, Andrés y José, por su alegría, tolerancia, y lealtad.

A mis maestros, por entregarme su apoyo y consejo, guiándome de forma oportuna y sabia a lo largo de mis estudios, motivándome a seguir y realizarme en el estudio de las ciencias.

A mis amigos y compañeros de universidad, que me llenaron de recuerdos felices, siempre alegres, leales y comprensivos, personas que siempre me apoyaron en los momentos que mas los necesité.

## ÍNDICE

Tema	Pág.
<b>I. Lista de Figuras.</b>	<b>VII</b>
<b>II. Lista de Tablas.</b>	<b>VIII</b>
<b>III. Abreviaturas.</b>	<b>IX</b>
<b>IV. Resumen.</b>	<b>X</b>
<b>V. Abstract.</b>	<b>XII</b>
<b>1. Introducción.</b>	<b>1</b>
Hipótesis.	7
Objetivo general.	8
Objetivos específicos.	8
<b>2. Materiales y Métodos.</b>	<b>9</b>
2.1. Reactivos.	9
2.2. Cepas de <i>F. konzum</i> y de <i>F. fujikuroi</i> y condiciones de cultivo.	9
2.3. Preparación de microsomas.	10
2.4. Ensayos enzimáticos.	11
2.5. Experimentos de metabolización de precursores de giberelinas	12
2.6. Cinética de metabolización de [ <sup>14</sup> C]-GA <sub>12</sub> o [ <sup>14</sup> C]-GA <sub>4</sub> , en presencia o ausencia de NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> en el medio de cultivo.	12
2.7. Cinética de metabolización ácido <i>ent</i> -[ <sup>14</sup> C]-kaurenoico, [ <sup>14</sup> C]-GA <sub>12</sub> , [ <sup>14</sup> C]-GA <sub>4</sub> o [ <sup>14</sup> C]-GA <sub>9</sub> .	12
2.8. Extracción de [ <sup>14</sup> C]-GAs desde el filtrado del cultivo.	13
2.9. Purificación de giberelinas marcadas con [ <sup>14</sup> C].	13
2.10. Cromatografía en HPLC.	13
2.11. Cuantificación de la radiactividad por centelleo líquido.	14
2.12. Identificación de los productos por espectrometría de masas.	14
<b>3. Resultados.</b>	<b>16</b>
3.1. Giberelinas sintetizadas por distintas cepas de <i>F. konzum</i> .	16
3.2. Metabolización de precursores de giberelinas por cepas de <i>F.</i>	

<i>konzum</i> .	19
3.3. Efecto del pH y del nitrato de amonio sobre la actividad de monooxigenasas de giberelinas.	21
3.4. Caracterización bioquímica de la cepa productora de GAs I <sub>3</sub> de <i>F. konzum</i> .	24
3.4a. Productos de metabolización de precursores derivados del <i>ent</i> -kaureno y del <i>ent</i> - giberelano.	24
3.4b. Reacciones de oxidación en C7 e hidroxilación en C3 en <i>F. konzum</i> y en <i>F. fujikuroi</i> .	28
3.4c. Oxidación del metilo 20 en <i>F. konzum</i> y en <i>F. fujikuroi</i> .	29
3.4d. Reacciones de desaturación y de hidroxilación en C13 en <i>F. konzum</i> y en <i>F. fujikuroi</i> .	29
3.4e. Velocidad de las reacciones catalizadas por monooxigenasas de giberelinas (GA <sub>14</sub> sintetasa, C20 oxidasa y 13-hidroxilasa) en <i>F. konzum</i> y en <i>F. fujikuroi</i>	31
3.5. Origen biosintético de las giberelinas GA <sub>1</sub> y GA <sub>3</sub> .Metabolismo de las GAs lactónicas <sup>14</sup> C-GA <sub>4</sub> , <sup>14</sup> C-GA <sub>9</sub> y <sup>14</sup> C-GA <sub>20</sub> .	33
3.6. Participación de las vías 3β-hidroxilada y no hidroxilada de la síntesis de GAs.	35
<b>4. Discusión.</b>	<b>37</b>
<b>5. Conclusiones.</b>	<b>42</b>
<b>6. Referencias.</b>	<b>44</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Secuencia de biosíntesis de GA <sub>3</sub> en <i>F. fujikuroi</i> .	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Estructura de GAs de 20 y 19 carbonos.	<b>3</b>
<b>Figura 3.</b> Perfiles de HPLC de los productos de metabolización de <sup>14</sup> C-GA <sub>12</sub> aldehído por distintas cepas de <i>F. konzum</i> .	<b>20</b>
<b>Figura 4.</b> Perfiles de HPLC de los productos de metabolización de <sup>14</sup> C-GA <sub>4</sub> por distintas cepas de <i>F. konzum</i> .	<b>20</b>
<b>Figura 5.</b> Perfiles de HPLC de los productos obtenidos de la incubación de cultivos de <i>F. konzum</i> con A) <sup>14</sup> C-GA <sub>12</sub> ; B) <sup>14</sup> C-GA <sub>9</sub> ; C) <sup>14</sup> C-GA <sub>4</sub> , en medios a pH 4,0 ó 2,7.	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b> Secuencia de biosíntesis de GAs propuesta para <i>F. konzum</i> .	<b>27</b>
<b>Figura 7.</b> Cinética de utilización de ácido <i>ent</i> - <sup>14</sup> C-kaurenoico por cultivos de <i>F. konzum</i> (cepa I <sub>3</sub> ) y de <i>F. fujikuroi</i> (cepa ACC917).	<b>28</b>
<b>Figura 8.</b> Cinética de utilización de <sup>14</sup> C-GA <sub>12</sub> por cultivos de <i>F. konzum</i> (cepa I <sub>3</sub> ) y de <i>F. fujikuroi</i> (cepa ACC917).	<b>29</b>
<b>Figura 9.</b> Cinética de utilización de <sup>14</sup> C-GA <sub>4</sub> por cultivos de <i>F. fujikuroi</i> (cepa ACC917) y de <i>F. konzum</i> (cepa I <sub>3</sub> ).	<b>30</b>
<b>Figura 10.</b> Cinética de utilización de <sup>14</sup> C-GA <sub>9</sub> por cultivos de <i>F. konzum</i> (cepa I <sub>3</sub> ) y de <i>F. fujikuroi</i> (cepa ACC917).	<b>30</b>
<b>Figura 11.</b> Metabolización de giberelinas lactónicas por <i>F. konzum</i> y <i>F. fujikuroi</i> .	<b>34</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Giberelinas y <i>ent</i> -kaurenoides producidos por cepas de <i>F. konzum</i> y de <i>F. fujikuroi</i> .	17
<b>Tabla 2.</b> Estructuras de las principales GAs y <i>ent</i> -kaurenoides sintetizados por <i>F. konzum</i> y <i>F. fujikuroi</i> .	18
<b>Tabla 3.</b> Efecto del $\text{NH}_4\text{NO}_3$ sobre la utilización de $^{14}\text{C}$ -GA <sub>12</sub> por <i>F. konzum</i> (cepa I <sub>3</sub> ).	23
<b>Tabla 4.</b> Velocidad de utilización de $^{14}\text{C}$ -GA <sub>4</sub> por la cepa I <sub>3</sub> de <i>F. konzum</i> en un medio de cultivo sin compuestos nitrogenados.	23
<b>Tabla 5.</b> Productos de metabolización de precursores de GAs, <i>ent</i> -kaurenoides o derivados del <i>ent</i> -giberelano, por cultivos de <i>F. konzum</i> (cepa I <sub>3</sub> ).	26
<b>Tabla 6.</b> Velocidad de las reacciones catalizadas por las monooxigenasas P450-1, P450-2 y P450-3 en <i>F. konzum</i> y en <i>F. fujikuroi</i> .	32
<b>Tabla 7.</b> Oxidación de $^{14}\text{C}$ -GA <sub>12</sub> aldehído por microsomas de <i>F. konzum</i> y de <i>F. fujikuroi</i> .	36



## ABREVIATURAS.

**AMO 1618:** Cloruro de 2-isopropil-4-dimetilamino-5metilfenil-1 piperidina-carboxilato.

**BSA:** Seroalbúmina de bovino.

**CDP:** Copalil difosfato.

**CPR:** NADPH-citocromo P450 reductasa.

**CPS/KS:** Copalil difosfato/*ent*-kaureno sintasa.

**DES:** Desaturasa.

**DTT:** Ditioneitol.

**EDTA:** Ácido etilendiamino tetraacético.

**FAD:** Flavina Adenina Dinucleótido (forma oxidada).

**FDP:** Farnesil difosfato.

**GAs:** Giberelinas.

**GC-MS:** Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

**GGDP:** Geranilgeranil difosfato.

**GGS2:** Geranilgeranil difosfato sintasa.

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta resolución.

**MO:** Monooxigenasa.

**MP:** Población de apareamiento.

**NADH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reducida).

**NADPH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (forma reducida).

**Tr:** Tiempo de retención.

## RESUMEN

El hongo filamentoso *Fusarium konzum* pertenece al complejo taxonómico *Gibberella fujikuroi* formado por 9 especies biológicas que se han aislado desde distintas plantas y que sintetizan diversos metabolitos secundarios. Dos especies del complejo, *F. fujikuroi* y *F. konzum*, producen giberelinas (GAs), diterpenos activos como fitohormonas. Las demás especies no producen GAs aunque contienen los genes respectivos o parte de ellos.

En este trabajo se caracterizó la biosíntesis de GAs en la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum* tanto a nivel de las reacciones químicas como de las enzimas que las catalizan y se comparó con la especie bien estudiada, *F. fujikuroi*. El análisis de GAs endógenas en distintas cepas de *F. konzum* indicó que el producto principal de la vía metabólica es la lactona 3,13-dihidroxiada GA<sub>1</sub>. También se encontró ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) aunque en menor cantidad. Mediante la administración de precursores marcados con <sup>14</sup>C a los cultivos líquidos, se determinó la secuencia biosintética para GA<sub>1</sub> en la que participan como intermediarios el ácido *ent*-kaurenoico, el GA<sub>12</sub> aldehído, y las giberelinas 3β-hidroxiadas GA<sub>14</sub> (C20) y GA<sub>4</sub> (C19). La vía 3β-hidroxiada es la principal y la vía no hidroxiada es menor. La reacción de hidroxiación en C13 ocurre al final de la secuencia, sobre el GA<sub>4</sub> en cambio la hidroxiación en C3β ocurre en una etapa temprana, a nivel del GA<sub>12</sub> aldehído.

En las incubaciones con ácido *ent*-<sup>14</sup>C-kaurenoico se acumularon los intermediarios <sup>14</sup>C-GA<sub>14</sub> y <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> en tanto que a partir del precursor <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> se formó el C20 alcohol (<sup>14</sup>C-GA<sub>15</sub>) y el C20 aldehído (<sup>14</sup>C-GA<sub>24</sub>) además del producto lactónico <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub>. Esto sugiere que las oxidasas de GAs presentan eficiencias reducidas en *F. konzum* lo que se confirmó determinando en los cultivos las velocidades de las reacciones respectivas. Se encontró que en la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum* la GA<sub>14</sub> sintasa oxida al ácido *ent*-<sup>14</sup>C-kaurenoico con una velocidad 397 veces menor que en la cepa ACC917 de *F. fujikuroi* mientras que la C20 oxidasa metaboliza el <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> con una velocidad reducida en un factor de 216. La reacción final de la secuencia, la 13-hidroxiación, es la etapa limitante de

la biosíntesis de GA<sub>1</sub> y presentó en *F. konzum*, una velocidad 48 veces menor que en *F. fujikuroi*.

Utilizando fracciones microsomales obtenidas del micelio de la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum* se demostró que la fuente de electrones para las reacciones de hidroxilación en 3β y oxidación en C7 del GA<sub>12</sub> aldehído es exclusivamente el NADPH, lo que sugiere que la citocromo P450 reductasa sería la proteína transportadora de electrones asociada a la GA<sub>14</sub> sintasa en este organismo y probablemente también estaría asociada a las demás monooxigenasas de GAs. Tanto la C20 oxidasa como la 13-hidroxilasa de *F. konzum* presentaron eficiencias similares en presencia y en ausencia de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> lo que sugiere que en esta especie de *Fusarium* el mecanismo de regulación por nitrógeno descrito en *F. fujikuroi* no es funcional o presenta una baja eficiencia. Esto generaría una baja expresión de los genes de la biosíntesis de GAs explicando la velocidad reducida de las reacciones estudiadas.

La secuencia de biosíntesis de giberelinas desde el ácido ent-kaurenoico hasta GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub> en *F. konzum* es similar a la de *F. fujikuroi* pero ambos sistemas difieren en la eficiencia de las oxidasas y en el mecanismo de inducción lo que explicaría la generación de distintos productos finales y la acumulación de intermediarios en *F. konzum*.

## ABSTRACT

### Catalytic functions of gibberellin oxidases in *Fusarium konzum*

The filamentous fungus *Fusarium konzum* belongs to the taxonomic complex *Gibberella fujikuroi* formed by nine biological species isolated from different plants which synthesize various secondary metabolites. Two species of the complex, *F. fujikuroi* and *F. konzum* produce gibberellins (GAs), diterpene metabolites active as phytohormones. The other species do not produce GAs even when they contain all or some of the GA-biosynthetic genes.

In this work gibberellin biosynthesis was characterized in *F. konzum* at the level of the chemical reactions as well as of the respective enzymes and was compared to the well known GA-producing species *F. fujikuroi*. Endogenous GAs analysis indicated that the main product was the 3,13-dihydroxylated lactone GA<sub>1</sub>. Gibberellic acid (3,13-dihydroxylated,  $\Delta$ 1,2; GA<sub>3</sub>) was also found in the cultures although at a lower level. The metabolic sequence for GA<sub>1</sub> biosynthesis was determined by adding <sup>14</sup>C-labelled precursors into liquid cultures of I<sub>3</sub> *F. konzum* strain which showed that *ent*-kaurenoic acid, GA<sub>12</sub> aldehyde, GA<sub>14</sub> (C20) and GA<sub>4</sub> (C19) are intermediates of the sequence. The 3 $\beta$ -hydroxylated pathway is the major pathway while the non-hydroxylated is a minor pathway. Hydroxylation at C13 occurs in a late step of the sequence over GA<sub>4</sub> or GA<sub>7</sub> in contrast to 3 $\beta$ -hydroxylation that occurs over GA<sub>12</sub> aldehyde at an early step.

In incubations with *ent*-<sup>14</sup>C-kaurenoic acid, the 3 $\beta$ -hydroxylated products <sup>14</sup>C-GA<sub>14</sub> and <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> accumulated while the C20 alcohol (<sup>14</sup>C-GA<sub>15</sub>) and the C20 aldehyde (<sup>14</sup>C-GA<sub>24</sub>) were formed from <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> besides the lactonic product <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub>. This result suggests that GA oxidases would have reduced catalytic efficiencies in *F. konzum* which was confirmed by determining the rates of the respective reactions in cultures of the strain I<sub>3</sub>. In this strain GA<sub>14</sub> synthase oxidized *ent*-<sup>14</sup>C-kaurenoic acid with a rate 397 times lower than in *F. fujikuroi* (ACC917 strain) while C20 oxidase metabolized <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> with a rate reduced by a factor of

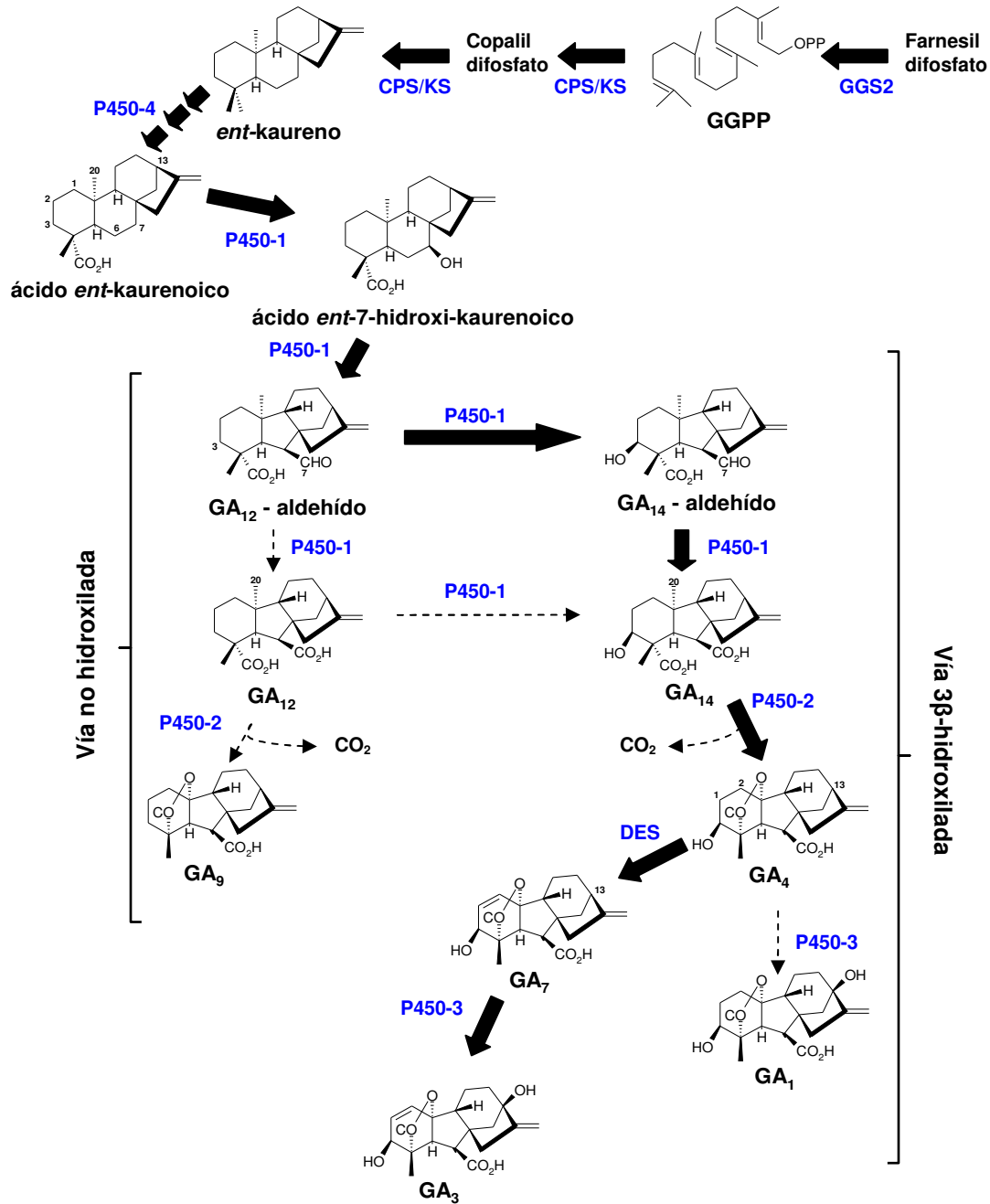
216. The last reaction of the sequence, 13-hydroxylation is the limiting step of GA biosynthesis and showed in *F. konzum* a rate 48 times lower than in *F. fujikuroi*. Microsomal fractions obtained from the mycelia of *F. konzum* catalyzed 3 $\beta$ -hydroxylation and C7-oxidation of GA<sub>12</sub> aldehyde exclusively in the presence of NADPH. This suggests that cytochrome P450 reductase would be the electron transport protein associated to GA<sub>14</sub> synthase and probably to the other GA monooxygenases in this *Fusarium* species. Gibberellin C20 oxidase as well as 13-hydroxylase have similar catalytic efficiencies in cultures containing ammonium nitrate or without this compound which suggests that nitrogen regulation of GA biosynthesis is not functional in *F. konzum* or has a low efficiency. This would explain the reduced rates found for the reactions catalyzed by GA monooxygenases in I<sub>3</sub>.

The biosynthetic sequence from *ent*-kaurenoic acid to GA<sub>1</sub> or to GA<sub>3</sub> is similar in *F. konzum* and in *F. fujikuroi* although both systems differ in the efficiency of the GA oxidases and in the effect ammonium nitrate which would result in different final products in both systems as well as in accumulation of intermediates in *F. konzum*.

## 1. INTRODUCCIÓN

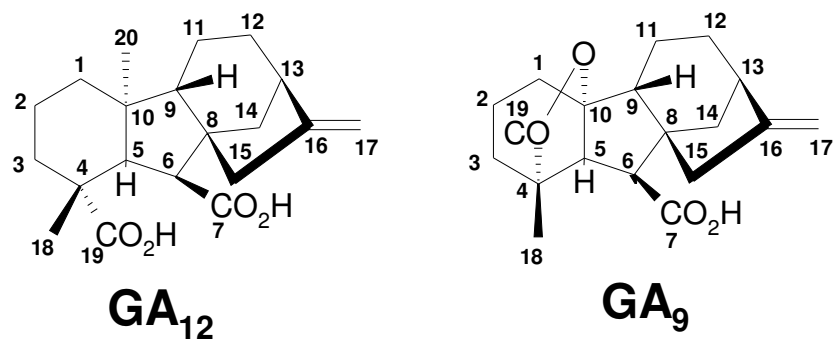
*Gibberella fujikuroi* es un hongo filamentoso que infecta plantas de arroz induciendo la enfermedad de superelongación, en la que el tallo crece exageradamente y la planta no da frutos (Hori, 1898). Este efecto se debe a la producción de ácido giberélico ( $GA_3$ ) (llamado inicialmente giberelina o toxina), diterpeno tetracíclico que estimula el crecimiento de tallos y brotes cuando es agregado externamente a las plantas (Hedden, 1978; Graebe, 1987). Recientemente se demostró que en realidad *G. fujikuroi* no corresponde a una única especie fúngica sino que mas bien es un complejo taxonómico, perteneciente al género *Fusarium*, formado por 9 especies biológicas a las cuales se llamó poblaciones de apareamiento (MP-A hasta MP-I) (Kerenyi et al., 1999, Zeller et al., 2003). Las distintas especies del complejo han sido aisladas desde plantas hospederas específicas (arroz, maíz, trigo, caña de azúcar, mango, etc.) en las que pueden producir enfermedades. Estas especies de *Fusarium* sintetizan numerosos metabolitos secundarios como las giberelinas (GAs), fumonisinas, moniliformina, ácido fusárico, entre otros (Malonek et al., 2005a; Leslie et al., 1992 y 2004), algunos de ellos tóxicos en humanos o animales. Las GAs, estimuladoras del crecimiento vegetal, son sintetizadas sólo por dos especies del complejo: *Fusarium fujikuroi* y *Fusarium konzum*, que corresponden a las poblaciones de apareamiento C e I respectivamente (Malonek et al., 2005c). La especie que infecta al arroz, *F. fujikuroi*, es el más eficiente productor de giberelinas en la naturaleza, específicamente ácido giberélico,  $GA_3$ . La concentración de  $GA_3$  en el medio de cultivo de *F. fujikuroi* puede llegar a 1 g/L en las cepas sobreproductoras (Mihlan et al., 2003). Los otros dos géneros de hongos que sintetizan GAs, *Sphaceloma sp.* y *Phaeosphaeria sp.* producen  $GA_4$  y  $GA_1$  respectivamente, en menor cantidad (Rademacher, 1992). En los sistemas fúngicos las GAs son metabolitos secundarios de función desconocida, a diferencia de los sistemas vegetales en que las GAs, que se sintetizan en bajísimas cantidades, actúan como hormonas regulando diversos aspectos del desarrollo y crecimiento como la

elongación celular, la división celular, la diferenciación de los tejidos y la dominancia apical (Graebe 1987; Hedden y Phillips, 2000).



**Figura 1.** Secuencia de biosíntesis de GA<sub>3</sub> en *F. fujikuroi*. Las flechas gruesas indican la vía principal, en la que participan intermediarios 3β-hidroxilados. Las enzimas que catalizan cada etapa se indican en azul. GGS2 (geranilgeranil difosfato sintasa); CPS/KS (copalil difosfato/*ent*-kaureno sintasa); P450-4 (*ent*-kaureno oxidasa); P450-1 (GA<sub>14</sub> sintasa); P450-2 (C20 oxidasa); P450-3 (13-hidroxilasa); DES (desaturasa 1,2).

Hasta la fecha se han descrito alrededor de 130 GAs las que se denominan por las siglas GA seguidas de un subíndice que indica el orden de identificación (GA<sub>3</sub>, GA<sub>1</sub>, GA<sub>14</sub>, etc.). Se dividen en dos grupos, las de 19 carbonos que incluyen a las GAs bioactivas como fitohormonas y las de 20 carbonos, precursoras de las anteriores y que no presentan actividad biológica (Figs.1 y 2).

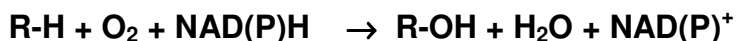


**Figura 2.** Estructura de GAs de 20 y 19 carbonos.

En los últimos años se ha caracterizado en detalle, en *F. fujikuroi*, la biosíntesis de GA<sub>3</sub> a partir de geranilgeranil difosfato (GGDP) tanto a nivel de los genes como de las enzimas (Hedden et al., 2002; Tudzynski, 2005). Las reacciones químicas respectivas se muestran en la fig. 1 y fueron determinadas en la década de los 70 mediante la administración de precursores marcados a cultivos líquidos del hongo y por la utilización de mutantes que no producen GAs endógenas (Bearder et al., 1975, MacMillan, 1997a). La secuencia metabólica consiste en dos reacciones iniciales de ciclación, en las que a partir de geranilgeranil difosfato (GGDP), se genera el copalil difosfato (CDP), y posteriormente el *ent*-kaureno, siguiendo por múltiples reacciones de oxidación sobre este hidrocarburo tetracíclico (Hedden, 1978, Cross et al., 1968, Bearder et al., 1975). Las oxidasas tienen, por lo tanto, un papel central en el metabolismo de las giberelinas fúngicas. Algunas de estas oxidasas fueron caracterizadas *in vitro*, específicamente la *ent*-kaureno oxidasa y la *ent*-kaurenoico oxidasa, encontrándose que presentan las propiedades esperadas para monooxigenasas P450 (Fall y West, 1971; Jennings et al., 1993; Urrutia et al., 2001). Sin embargo el último producto detectado *in vitro* es el GA<sub>14</sub> y las reacciones posteriores de la vía, de oxidación del C-20, desaturación 1,2 e hidroxilación en C13 no se han



podido demostrar en extractos enzimáticos (Urrutia et al., 2001; Rojas et al., 2004). En 1998 se clonaron y caracterizaron los genes de la biosíntesis de GAs en *F. fujikuroi* lo que permitió completar la caracterización molecular de este proceso mediante el uso de mutantes de disrupción o de transformantes con genes únicos (Tudzynski et al., 2001; Rojas et al., 2001; Tudzynski et al., 2003). Siete genes agrupados en un cluster en el genoma de *F. fujikuroi* codifican para todas las enzimas de la vía, que catalizan las 15 etapas de la biosíntesis de GA<sub>3</sub>, incluyendo la biosíntesis de GGDP a partir de farnesil difosfato (FDP) (Fig. 1)(Tudzynski y Höltter, 1998; Linnemanstöns et al., 1999). Cuatro de los siete genes de GAs codifican para monooxigenasas (MO) hemínicas relacionadas con el citocromo P450 (se denominaron P450-1, P450-2, P450-3 y P450-4 de acuerdo a su orden de identificación) (Tudzynski y Höltter, 1998; Hedden et al., 2002). Esto indica que la mayor parte de las reacciones de oxidación de la biosíntesis de GAs son catalizadas por monooxigenasas P450. La reacción general catalizada por estas monooxigenasas es la siguiente:



El sustrato orgánico y el O<sub>2</sub> se unen al sitio activo de la monooxigenasa, el O<sub>2</sub> directamente al Fe hemínico, en tanto que el reductor se une a una proteína transportadora de electrones asociada a la monooxigenasa (Donaldson y Luster, 1991).

La mayoría de las MO de GAs de *F. fujikuroi* son enzimas multifuncionales que catalizan varias reacciones de oxidación en la secuencia biosintética, ya sea oxidando sucesivamente un mismo centro carbonado como en la *ent*-kaureno sintasa (P450-4, Tudzynski et al., 2001) y la C20 oxidasa (P450-2, Tudzynski et al., 2002) o bien oxidando distintos carbonos adyacentes o distantes en la estructura como en la GA<sub>14</sub> sintasa (P450-1, Rojas et al., 2001) (Fig. 1). La *ent*-kaureno oxidasa convierte el metilo C-19 en ácido carboxílico en tanto que la C-20 oxidasa oxida el metilo en C-20 hasta CO<sub>2</sub>. La GA<sub>14</sub> sintasa cataliza la hidroxilación en 3β y la oxidación en C-7 del ácido *ent*-kaurenoico (Fig. 1). En *F.*

*fujikuroi* las monooxigenasas de GAs se encuentran asociadas a las membranas del retículo endoplásmico y reciben electrones desde el NADPH a través de la citocromo P450 reductasa (CPR) (Malonek et al., 2004). Existe además en *F. fujikuroi* un sistema transportador alternativo, el sistema citocromo b5/b5 reductasa, que entrega electrones desde el NADH a las MO de GAs en ausencia de la CPR aunque con una menor eficiencia (Troncoso et al., 2008).

Ensayos de Southern blot usando sondas para los distintos genes de GAs, han demostrado que la mayor parte de las especies del complejo *G. fujikuroi* contiene todos los genes del cluster con excepción de las poblaciones de apareamiento A y H que contienen sólo dos o uno de los siete genes (Malonek et al., 2005c). Sin embargo las únicas especies que producen giberelinas son *F. fujikuroi* (población de apareamiento C) y algunas cepas de *F. konzum* (población de apareamiento I) esta última recientemente descrita (Malonek et al., 2005c; Zeller et al., 2003). Las especies de *F. konzum* no han sido caracterizadas a nivel molecular con respecto a esta capacidad biosintética. En las especies no productoras del complejo *G. fujikuroi* los genes y enzimas de la biosíntesis de GAs presentan niveles variables de expresión (Malonek et al., 2005c). En *F. proliferatum*, un patógeno del maíz que no produce GAs, se ha caracterizado en detalle la expresión de los genes y la actividad de las enzimas de la biosíntesis de GAs (Malonek et al., 2005a, y 2005b). Dos etapas iniciales de la vía, la síntesis de GGDP y la síntesis del *ent*-kaureno, se encuentran bloqueadas debido a múltiples mutaciones en las regiones promotoras y/o codificantes de los genes de la GGDP sintasa y de la *ent*-kaureno sintasa (*cps/ks*) (Fig.1). Los demás genes, de la GA<sub>14</sub> sintasa, C-20 oxidasa y 13-hidroxilasa codifican para proteínas activas en *F. proliferatum* aunque algunos presentan un bajo nivel de expresión (Malonek et al., 2005 a y b).

Con respecto a la regulación de la biosíntesis de GAs en *F. fujikuroi*, ésta se induce cuando se agota la fuente nitrogenada en el medio de cultivo (amonio, glutamina, asparragina o nitrato). Este es el principal mecanismo regulador en esta vía biosintética y ha sido estudiado en detalle en este hongo (Tudzynski et al., 1999a y 1999b; Mihlan et al., 2003). El factor transcripcional AREA, que regula en

*F. fujikuroi* el metabolismo de distintos compuestos carbonados de acuerdo a la presencia de compuestos nitrogenados en el medio, es el principal regulador de la expresión de los genes de GAs, los que contienen en su región promotora secuencias GATA de unión a AEA (Mihlan et al., 2003). Una excepción la constituye el gen *P450-3* (que codifica para la 13-hidroxisasa) que se expresa tanto en presencia como en ausencia de compuestos nitrogenados (Tudzynski et al., 2003). Existen sin embargo otros factores además de AEA, que regulan la biosíntesis de GAs en *F. fujikuroi*, como la TOR quinasa, que también influye en la expresión de los genes de la biosíntesis de GAs (Teichert et al., 2006) lo que evidencia una eficiencia y complejidad en el mecanismo de regulación que sugiere que las GAs sintetizadas por el hongo deberían tener una función importante para este organismo. En la mayoría de las otras especies del complejo *G. fujikuroi* no se ha determinado si el mecanismo de regulación es funcional o si ha sufrido alguna mutación que lo haga ineficiente. En *F. proliferatum* se encontró que los genes de GAs de *F. fujikuroi* complementados en la cepa D02945 de *F. proliferatum* se expresan eficientemente restaurando en la especie no productora la capacidad de biosintetizar GA<sub>3</sub> (Malonek et al., 2005b). Esto indica que el mecanismo de regulación de la expresión de los genes de GAs es funcional en *F. proliferatum*.

En esta memoria de título se abordó la caracterización de la biosíntesis de GAs en *Fusarium konzum*, la única especie del complejo, además de *F. fujikuroi*, que produce GAs (Malonek et al., 2005c). Esta especie, aislada de pastos de las praderas de Kansas, fue descrita el año 2003 (Zeller et al., 2003) y se demostró que contiene todos los genes de la biosíntesis de GAs (Malonek et al., 2005c). No se ha descrito que el hongo sea un patógeno en esta especie sino que más bien tendrían una asociación mutualística. Los genes de la desaturasa y de la 13-hidroxisasa de *F. konzum* se expresan a un menor nivel que en *F. fujikuroi* (Malonek et al., 2005c). No hay información acerca de la expresión de los otros genes de GAs. El patrón de giberelinas producidas por la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum*, es distinto del que presenta *F. fujikuroi* lo que sugiere que podrían haber diferencias a nivel molecular entre ambas especies. La GA lactónica, 3,13-

hidroxilada, GA<sub>1</sub> es el producto principal seguido por GA<sub>3</sub> (que contiene además una insaturación 1,2) y pequeñas cantidades de GA<sub>9</sub> (lactona no hidroxilada) y de GA<sub>20</sub> (lactona 13-hidroxilada). La principal GA sintetizada por *F. fujikuroi* en cambio es GA<sub>3</sub> (Malonek et al., 2005c) y no se detecta GA<sub>20</sub>. La presencia de este último producto evidencia la participación de la vía no hidroxilada puesto que GA<sub>20</sub> se genera a partir de GA<sub>9</sub> por acción de la 13-hidroxilasa cuando este sustrato está disponible (MacMillan, 1997a). Mediante la administración de precursores de giberelinas marcados con <sup>14</sup>C y la identificación de los productos de metabolización, se pudo establecer una secuencia biosintética para los productos finales GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> y GA<sub>20</sub> en la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum*. Además se determinó la velocidad de las reacciones catalizadas por las monoxigenasas P450-1, P450-2 y P450-3 en esta especie fúngica y se compararon con las respectivas reacciones en la cepa ACC917 de *F. fujikuroi*. Finalmente se investigó la funcionalidad del mecanismo de regulación por compuestos nitrogenados en *F. konzum*.

## HIPÓTESIS

Las actividades de las oxidasas de giberelinas en *F. konzum* se encuentran alteradas o reducidas respecto a las oxidasas de *F. fujikuroi*. Esto explica la producción de giberelinas no hidroxiladas y del producto final GA<sub>1</sub> en *F. konzum*.

En cepas de *F. konzum* que no sintetizan GAs, algunas de las oxidasas de giberelinas son activas.

## OBJETIVO GENERAL

Investigar las funciones catalíticas de las oxidasas de giberelinas en *F. konzum*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Investigar en la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum* la especificidad de sustrato de la 13-hidroxilasa de giberelinas, por medio de la adición de las giberelinas <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> y <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> al cultivo, y posterior identificación los productos.

2.- Identificar los productos de metabolización de la giberelina <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> por la cepa I<sub>3</sub>. Determinar las giberelinas de 20 carbonos y/o 19 carbonos sintetizadas a partir del precursor añadido.

3.- Caracterizar las funciones catalíticas de la GA<sub>14</sub> sintasa en cultivos de *F. konzum* mediante la identificación de los productos de metabolización del ácido *ent*-<sup>14</sup>C-kaurenoico, <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> aldehído y <sup>14</sup>C-GA<sub>20</sub>. Además en microsomas obtenidos del micelio se investigará la cantidad de <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> y <sup>14</sup>C-GA<sub>14</sub> sintetizado a partir de <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> aldehído en presencia de distintos cofactores.

4.- Investigar si las oxidasas de GAs están activas en cepas de *F. konzum* que no producen giberelinas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Reactivos

Todos los reactivos empleados fueron de grado pro análisis, excepto el metanol que fue grado HPLC. Los sustratos, ácido [ $^{14}\text{C}$ ]-*ent*-kaurenoico (radiactividad específica de 7,51 TBq/mol), [ $^{14}\text{C}$ ]-GA<sub>12</sub> aldehído (radiactividad específica de 6,81 TBq/mol) y [ $^{14}\text{C}$ ]-GA<sub>12</sub> (radiactividad específica de 4,4 TBq\*/mol) fueron sintetizados a partir de ácido R-[ $^{14}\text{C}$ ]-mevalónico (Amersham) utilizando un preparado enzimático de endosperma de calabaza en presencia de ATP MgCl<sub>2</sub> y NADPH como cofactores (Urrutia et al., 2001; MacMillan et al., 1997b). Se utiliza este preparado porque contiene una alta concentración de las enzimas de la biosíntesis de giberelinas (Graebe et al., 1974) y permite sintetizar los intermediarios requeridos para este trabajo hasta [ $^{14}\text{C}$ ]-GA<sub>12</sub>. Las oxidasas que participan hasta [ $^{14}\text{C}$ ]-GA<sub>12</sub> son monooxigenasas P450 a diferencia de las reacciones posteriores que son catalizadas por dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato que requieren Fe<sup>2+</sup> y 2-oxoglutarato (Graebe et al., 1974). Los precursores [ $^{14}\text{C}$ ]-GA<sub>4</sub>, [ $^{14}\text{C}$ ]-GA<sub>9</sub> y [ $^{14}\text{C}$ ]-GA<sub>20</sub> fueron sintetizados químicamente en la Universidad de Canberra, Australia por el profesor L. Mander.

### 2.2 Cepas de *F. konzum* y de *F. fujikuroi* y condiciones de cultivo

Se utilizaron las siguientes cepas:

ACC917 e IMI58285: cepas silvestres de *F. fujikuroi* productoras de GAs obtenidas de la colección de cultivos fúngicos (Weimar, Alemania).

I<sub>3</sub>, I<sub>8</sub>, I<sub>9</sub>, I<sub>10</sub>, I<sub>11</sub>, I<sub>12</sub> e I<sub>18</sub>: cepas silvestres de *F. konzum* provenientes de las praderas de Kansas, aisladas por el Dr. John F. Leslie de la Universidad del Estado de Kansas y proveídas por la Dr. Bettina Tudzynski, del Instituto de Botánica de la Universidad de Münster, Alemania.

Las cepas fueron conservadas en placas de agar papa dextrosa a 4°C. Para los experimentos de metabolización se inocularon trozos de agar a 50 mL de medio líquido ICI 40% (Geissman et al., 1966). Este contiene 1,92 g/L de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 80 g/L de glucosa, 5 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,1 % de solución de

elementos traza (100 mL de solución contiene: 0,01 g de  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g de  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,015 g de  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,161 g de  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  y 0,01 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$ ). Los cultivos se incubaron por 3 días con agitación orbital (150 rpm) a 28°C para permitir el crecimiento de los hongos. Alícuotas de estos medios fueron filtradas para separar el micelio, el que luego fue lavado dos veces con medio ICI 40% o ICI 0% (igual al anterior, pero que no contiene  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), separando el micelio por filtración. Para los análisis de GAs endógenas, el micelio fue resuspendido en medio ICI 0%, se tomó una alícuota de 2-5 mL la que se llevó a 10 mL con medio ICI 0%, para inducir la síntesis de GAs. Se mantuvieron los cultivos con agitación orbital por 7 días a 28° C, al cabo de los cuales se filtraron para detener la reacción y extraer los productos como se describe en la sección 2.8. Los extractos de acetato de etilo obtenidos, purificados por cromatografía en fase sólida (sección 2.9) fueron analizados por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS, sección 2.12). A diferencia de los ensayos con  $^{14}\text{C}$ -GAs, se analizaron los extractos directamente para identificar el conjunto total de GAs y *ent*-kaurenoídes sintetizados. Para los análisis de metabolización de precursores de la síntesis de GAs, se procedió de la misma manera, pero los medios de cultivo con que se lavaron y resuspendieron las muestras correspondieron a medios ICI 40% o ICI 0%, a los que se añadió AMO 1618, un inhibidor de la síntesis de GAs, para evitar la presencia de GAs endógenas, y se ajustaron los medios a pH 4,0 o 2,7 mediante la adición de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. Desde el micelio resuspendido, se tomaron alícuotas de 1-2 mL, las que se completaron a 10 mL, con los medios antes señalados. Las condiciones de cultivo y la adición de los distintos precursores marcados se detallan más adelante (secciones 2.5, 2.6 y 2.7). Para la preparación de microsomas, se transfirieron alícuotas de 4-6 mL del precultivo en medio ICI 40% a 4-6 matraces con 100 mL de medio 0% ICI y se incubaron por 7 días con agitación a 28°C.

### **2.3 Preparación de microsomas**

El micelio crecido bajo condiciones inductoras de la síntesis de GAs, se cosechó por filtración al vacío (4-6 matraces con 100 mL de cultivo que dan

alrededor de 1 g de micelio). Después de lavar el micelio alternativamente con H<sub>2</sub>O nanopura y una solución tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 5 mM) fue filtrado al vacío, pesado y resuspendido en la solución de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 5 mM; DTT 4 mM; sacarosa 0,25 M y BSA 10mg/mL). Se utilizaron 10 mL de solución de extracción por 1-5 g de micelio (peso fresco). La suspensión fue congelada a -20° C hasta el momento de romper las células para preparar el extracto enzimático.

Para preparar el extracto se utilizó una prensa "X-press" (AB BIOX, Suecia) enfriada a -30° C. La suspensión de micelio congelada a -30° C fue sometida a una presión de 28.000 psi, lo que permite el flujo de la muestra a través de un orificio de pequeño diámetro debido al cambio de estado sólido a líquido del H<sub>2</sub>O por efecto de la presión. La ruptura de las células se produce por la descompresión (Edebo, 1983). El homogenizado resultante fue descongelado y centrifugado a 10.000xg por 30 min a 4° C. Los microsomas se obtuvieron por centrifugación del sobrenadante de 10.000xg a 100.000xg por 1 hora. El pellet de 100.000xg (P100) fue suspendido en 0,5 ml de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM a pH 7,5; DTT 4 mM; sacarosa 0,2M y de BSA 10 mg/mL. La suspensión microsomal fue distribuida en alícuotas de 50 µL, congelada en nitrógeno líquido y almacenada a -70° C.

## **2.4 Ensayos enzimáticos**

La actividad de la monooxigenasa P450-1 fue determinada en 100 µL de un medio de reacción que contenía: Tris-HCl 50 mM pH 7,5; 5-10 µL de suspensión microsomal; 20.000 dpm de [<sup>14</sup>C]-GA<sub>12</sub> aldehído; FAD 5 o 50 µM, NADPH 10 mM o NADH 10 mM y NaCl 0,1 M.

El medio de reacción se incubó con agitación a 28°C por 1 hora. Para detener la reacción se agregaron 10 µL de ácido acético, 1,6 mL de H<sub>2</sub>O acidificada a pH 3,0 con ácido acético y 0,4 mL de metanol. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía en fase sólida en columnas C18 de 100 mg (cartuchos Bakerbond C18 J.T. Baker) y se analizó por HPLC.



## 2.5 Experimentos de metabolización de precursores de giberelinas

Se agregó a una suspensión del micelio en medio 0% ICI con AMO 1618 (entre 80-100 mg de micelio/10 mL de medio de cultivo) uno de los precursores marcados con  $^{14}\text{C}$ : ácido *ent*- $^{14}\text{C}$ -kaurenoico,  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>12</sub> aldehído,  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>12</sub>,  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>4</sub>,  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>9</sub> o  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>20</sub> en forma de una solución metanólica (10-150  $\mu\text{L}$ ; 30000- 400000 dpm). Previamente a la adición de los precursores se ajustó el pH del medio de cultivo en 4,0 o se llevó hasta 2,7 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. El cultivo se incubó por 2,5 días a 28°C con agitación orbital a 150 rpm. Los productos de metabolización se aislaron desde el filtrado después de separar el micelio por filtración como se indica en la sección 2.8.

## 2.6 Cinética de metabolización de $^{14}\text{C}$ -GA<sub>12</sub> o $^{14}\text{C}$ -GA<sub>4</sub>, en presencia o ausencia de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> en el medio de cultivo.

La metabolización de  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>12</sub> o  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>4</sub> se midió a distintos tiempos en cultivos ICI 40% o ICI 0% a pH 2,7 que contenían AMO 1618 (10 mL medio). A la suspensión se le agregó inmediatamente el precursor marcado y en otros casos se le agregó el precursor después de 1 o 7 días de preincubación en medio 0% ICI. Los cultivos se incubaron a 28°C con agitación por 16 y 24 horas. A estos tiempos se tomaron alícuotas de los cultivos (10 mg de micelio), las que fueron filtradas para detener la reacción y extraer los productos. El filtrado se extrajo con acetato de etilo. Luego se evaporó el solvente, se realizó extracción en fase sólida en columnas C18 de 100 mg (Bakerbond C18 J.T. Baker). La muestra fue analizada por HPLC.

## 2.7 Cinética de metabolización del ácido *ent*- $^{14}\text{C}$ -kaurenoico, $^{14}\text{C}$ -GA<sub>12</sub>, $^{14}\text{C}$ -GA<sub>4</sub> o $^{14}\text{C}$ -GA<sub>9</sub>.

La metabolización de los precursores se midió a distintos tiempos en cultivos de la cepa I<sub>3</sub> o de la cepa ACC917, en medios ICI 0% a pH 2,7 que contenían AMO 1618 (10 mL medio). A las suspensiones se les agregó el precursor marcado en forma metanólica, y se incubaron los cultivos a 28°C con agitación. A diversos tiempos luego de añadir el precursor (entre 10 min y 7 días)

se tomaron alícuotas desde los medios en incubación (10 mg. micelio), las que se filtraron para detener la reacción y extraer los productos. El filtrado se extrajo con acetato de etilo. Luego se evaporó el solvente, se realizó extracción en fase sólida en columnas C18 de 100 mg (Bakerbond C18 J.T. Baker). La muestra fue analizada por HPLC.

## **2.8 Extracción de [<sup>14</sup>C]-GAs desde el filtrado del cultivo**

El filtrado obtenido (3-10 mL) después de separar el micelio y lavarlo con H<sub>2</sub>O a pH 7,0 fue acidificado hasta pH 3,0 con HCl 2N en caso de presentar un valor de pH > 3. Las giberelinas se extrajeron por partición con acetato de etilo (una extracción 1:1; dos extracciones 1:0,5). Las fases orgánicas combinadas fueron evaporadas a presión reducida en un Rotavapor R10 (M.R. Büchi) a 38° C y las GAs fueron disueltas en 2 mL de metanol al 20%. La muestra se aplicó en una columna de extracción en fase sólida C18 (Bakerbond, J.T. Baker, 100 mg) y se separaron los productos por HPLC.

## **2.9 Purificación de giberelinas marcadas con [<sup>14</sup>C]**

Se utilizaron columnas de extracción en fase sólida C18 de 100 mg (Bakerbond, J.T. Baker) previamente activadas con 2 mL de metanol. Las columnas se equilibraron con 2 mL de agua acidificada a pH 3,0 antes de aplicar la muestra. Después de aplicar la muestra se lavó la columna con 2 mL de agua acidificada a pH 3,0 y finalmente las GAs se eluyeron con 2 mL de metanol. El eluido fue evaporado a presión reducida en un equipo SpeedVac plus SC110A (Termo Savant) o mediante flujo superficial de nitrógeno.

## **2.10 Cromatografía en HPLC**

Se usó un cromatógrafo Waters 600 equipado con una columna de fase reversa C18 de 250x4 mm (Symmetry, Waters). Las corridas consistieron en una gradiente lineal de 30 min de metanol en H<sub>2</sub>O pH 3,0 desde 60% hasta 100% metanol seguida por 6 min de flujo isocrático de MeOH. El flujo fue de 1 mL/min y se colectaron fracciones de 1 mL en las que se determinó la radiactividad por

centelleo líquido. Los productos se identificaron por co-cromatografía con estándares de GAs marcadas con  $^{14}\text{C}$  o bien fueron derivatizados para la identificación por GC/MS.

Los tiempos de retención de los estándares obtenidos por HPLC fueron:

<b>Compuesto*</b>	<b>Tiempo de Retención (min)</b>
ácido [ $^{14}\text{C}$ ]- <i>ent</i> -kaurenoico	<b>35</b>
[ $^{14}\text{C}$ ]-GA <sub>12</sub> aldehído	<b>25</b>
[ $^{14}\text{C}$ ]-GA <sub>12</sub>	<b>24</b>
[ $^{14}\text{C}$ ]-GA <sub>14</sub>	<b>14</b>
[ $^{14}\text{C}$ ]-GA <sub>9</sub>	<b>20</b>
[ $^{14}\text{C}$ ]-GA <sub>20</sub>	<b>11</b>
[ $^{14}\text{C}$ ]-GA <sub>24</sub>	<b>17</b>
[ $^{14}\text{C}$ ]-GA <sub>4</sub>	<b>13</b>
[ $^{14}\text{C}$ ]-GA <sub>25</sub>	<b>15</b>

\* Ordenados en orden a la secuencia metabólica.

### **2.11 Cuantificación de la radiactividad por centelleo líquido**

La radiactividad de las muestras se cuantificó en el contador Packard Tri-Carb modelo 1600 TR. El líquido de centelleo contenía 0,125 g de POPOP (1,4-bis-[2-(5-feniloxazol)]-benceno) y 4 g de PPO (2,5-difeniloxazol) en 1 L de tolueno grado técnico. Esta mezcla se diluyó con 500 mL del detergente Arcopal después de su disolución para completar la solución de centelleo.

### **2.12 Identificación de los productos por espectrometría de masas**

La identificación de los productos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se realizó en el Laboratorio de Hormonas Vegetales de Rothamsted Research, UK, en base a los espectros de masa y los

índices de retención de Kovats de giberelinas estándar (Gaskin y MacMillan, 1991). Estos se compararon con los de las giberelinas obtenidas como producto de metabolización. Las muestras fueron metiladas con diazometano etéreo y transformadas en los trimetilsilil ésteres por calentamiento con N-trimetilsilil-N-fluoroacetamida (MSTFA) a 90°C por 30 min antes del análisis (Urrutia et al., 2001).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Giberelinas sintetizadas por distintas cepas de *F. konzum*

Las GAs sintetizadas por *F. konzum* son secretadas al medio de cultivo, desde donde pueden aislarse por partición en acetato de etilo después de acidificar la fase acuosa. Con el objeto de comparar el patrón de GAs que produce *F. konzum* con las sintetizadas por la especie bien estudiada, *F. fujikuroi*, se aislaron las GAs y *ent*-kaurenoides producidas por diferentes cepas y se identificaron por GC-MS después de purificarlas por extracción en fase sólida (Tablas 1 y 2). Las cepas analizadas fueron las cepas I<sub>8</sub>, I<sub>12</sub> e I<sub>18</sub>. Se incluyó en la comparación la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum* y la cepa silvestre IMI58285 de *F. fujikuroi* cuya composición de GAs ya ha sido descrita (Malonek et al., 2005c).

La principal GA producida por las cepas I<sub>3</sub>, I<sub>8</sub> e I<sub>12</sub> corresponde a GA<sub>1</sub>, producto lactónico 3,13-hidroxiado, seguido por GA<sub>3</sub> que se produce en menor cantidad (Tablas 1 y 2). Este último producto difiere del anterior en la presencia de un doble enlace en la posición 1,2 (Fig. 1)(Tabla 2). En *F. fujikuroi* en cambio, la principal GA producida es el ácido giberélico, GA<sub>3</sub>, y prácticamente no se produce GA<sub>1</sub>. Esto sugiere que en *F. konzum*, a diferencia de *F. fujikuroi*, la 13-hidroxiolasa presentaría una mayor actividad que la desaturasa de GAs generando distintos productos finales desde el precursor GA<sub>4</sub> (Fig 1). Otra diferencia entre ambas especies se refiere a la presencia en *F. konzum* de varios productos no hidroxiados en el medio de cultivo, algunos de 20 carbonos (GA<sub>25</sub>, GA<sub>24</sub>) con el C20 al estado de oxidación de aldehído o ácido carboxílico. Además se detectó el producto de 19 carbonos 13-hidroxiado (GA<sub>20</sub>). La detección de este último producto, ausente en *F. fujikuroi*, sugiere que en *F. konzum* participa la vía no hidroxiada puesto que GA<sub>20</sub> se genera a partir de la GA lactónica GA<sub>9</sub>, el producto final de esta secuencia (MacMillan, 1997a; Fig. 1).

Los kaurenoides detectados (ácidos fujenoicos y kaurenolidos) corresponden a productos laterales de la GA<sub>14</sub> sintasa que se generan como alternativas de estabilización de los radicales que participan en el mecanismo catalítico de esta monooxigenasa (Rojas et al., 2004). La formación de

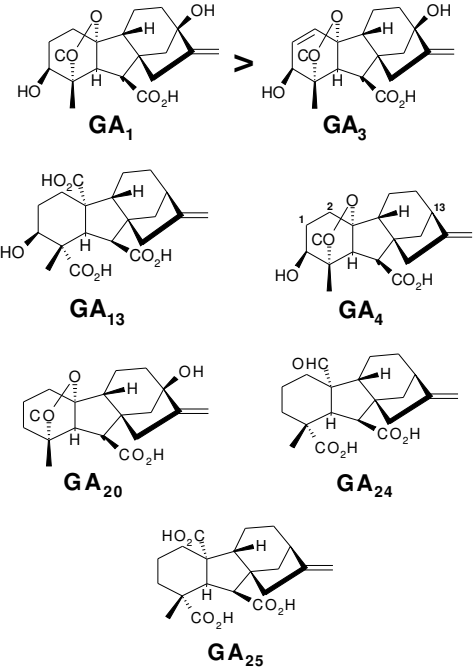
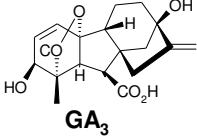
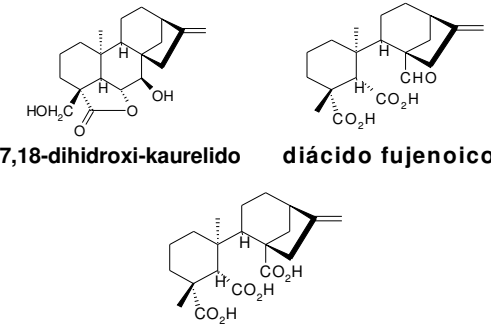
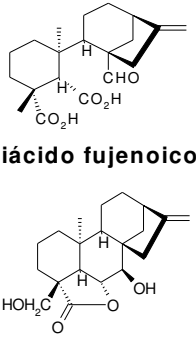
kaurenoides en *F. konzum* podría deberse a una baja actividad de la GA<sub>14</sub> sintasa, que favorecería las reacciones laterales, ya sea por diferencias estructurales de la enzima debido a mutaciones o bien por una baja eficiencia en el flujo de electrones desde las proteínas transportadoras asociadas (Troncoso et al., 2008). Entre las cepas de *F. konzum* analizadas se encontró una cepa (I<sub>18</sub>) que prácticamente no genera giberelinas lo cual indica que las distintas cepas de esta especie presentan una variabilidad con respecto a esta capacidad biosintética.

**Tabla 1.** Giberelinas y *ent*-kaurenoides producidos por cepas de *F. konzum* y de *F. fujikuroi*.

<b>Especie (cepa)</b>	<b>Giberelinas *</b>	<b><i>ent</i>-Kaurenoides*</b>
<i>F. konzum</i> , I <sub>3</sub>	GA <sub>1</sub> > GA <sub>3</sub> (3,13-hidroxiada) Iso GA <sub>3</sub> (3,13-hidroxiada) GA <sub>13</sub> (3β-hidroxiada) GA <sub>20</sub> (13-hidroxiada) GA <sub>25</sub> , GA <sub>24</sub> (no hidroxiada)	Diácido Fujenoico 7β,18-diOH-kaurenolido
<i>F. konzum</i> , I <sub>8</sub>	GA <sub>1</sub> > GA <sub>3</sub> (3,13-hidroxiada) Iso GA <sub>3</sub> (3,13-hidroxiada) GA <sub>13</sub> > GA <sub>4</sub> (3β-hidroxiada) GA <sub>20</sub> (13-hidroxiada) GA <sub>25</sub> , GA <sub>24</sub> (no hidroxiada, trazas)	Triácido fujenoico 7β,18-diOH-kaurenolido
<i>F. konzum</i> , I <sub>12</sub>	GA <sub>1</sub> > GA <sub>3</sub> (3,13-hidroxiadas) GA <sub>13</sub> > GA <sub>4</sub> (3β-hidroxiada) GA <sub>20</sub> (13-hidroxiada) GA <sub>25</sub> , GA <sub>24</sub> (no hidroxiada, trazas)	Diácido fujenoico 7β,18-diOH-kaurenolido
<i>F. konzum</i> , I <sub>18</sub>	GA <sub>1</sub> , GA <sub>3</sub> (trazas)	-----
<i>F. fujikuroi</i> (IMI 58285)	GA <sub>3</sub> (3,13-hidroxiada) > > > GA <sub>1</sub> GA <sub>4</sub> , GA <sub>7</sub> (trazas)	Diácido fujenoico 7β,18-diOH-kaurenolido

\* Detectados en el medio de cultivo e identificados por GC-MS. En orden decreciente de abundancia en el extracto de acetato de etilo.

**Tabla 2.** Estructuras de las principales GAs y *ent*-kaurenoides sintetizados por *F. konzum* y *F. fujikuroi*.

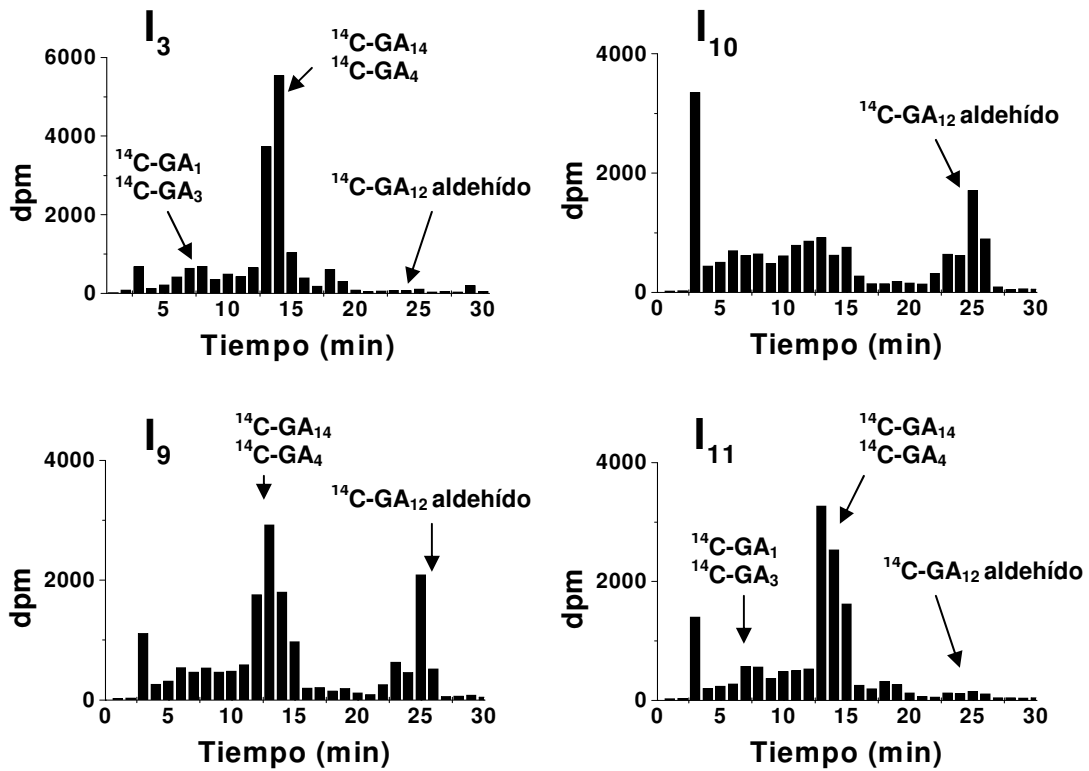
GAs producidas por <i>F. konzum</i>	GAs producidas por <i>F. fujikuroi</i>
 <p><b>GA<sub>1</sub></b>      <b>GA<sub>3</sub></b></p> <p><b>GA<sub>13</sub></b>      <b>GA<sub>4</sub></b></p> <p><b>GA<sub>20</sub></b>      <b>GA<sub>24</sub></b></p> <p><b>GA<sub>25</sub></b></p>	 <p><b>GA<sub>3</sub></b></p>
<b><i>ent</i>-kaurenoides producidos por <i>F. konzum</i></b>	<b><i>ent</i>-kaurenoides producidos por <i>F. fujikuroi</i></b>
 <p><b>7,18-dihidroxi-kaurelido</b>      <b>diácido fujenoico</b></p> <p><b>triácido fujenoico</b></p>	 <p><b>diácido fujenoico</b></p> <p><b>7,18-dihidroxi-kaurelido</b></p>

### 3.2 Metabolización de precursores de giberelinas por cepas de *F. konzum*.

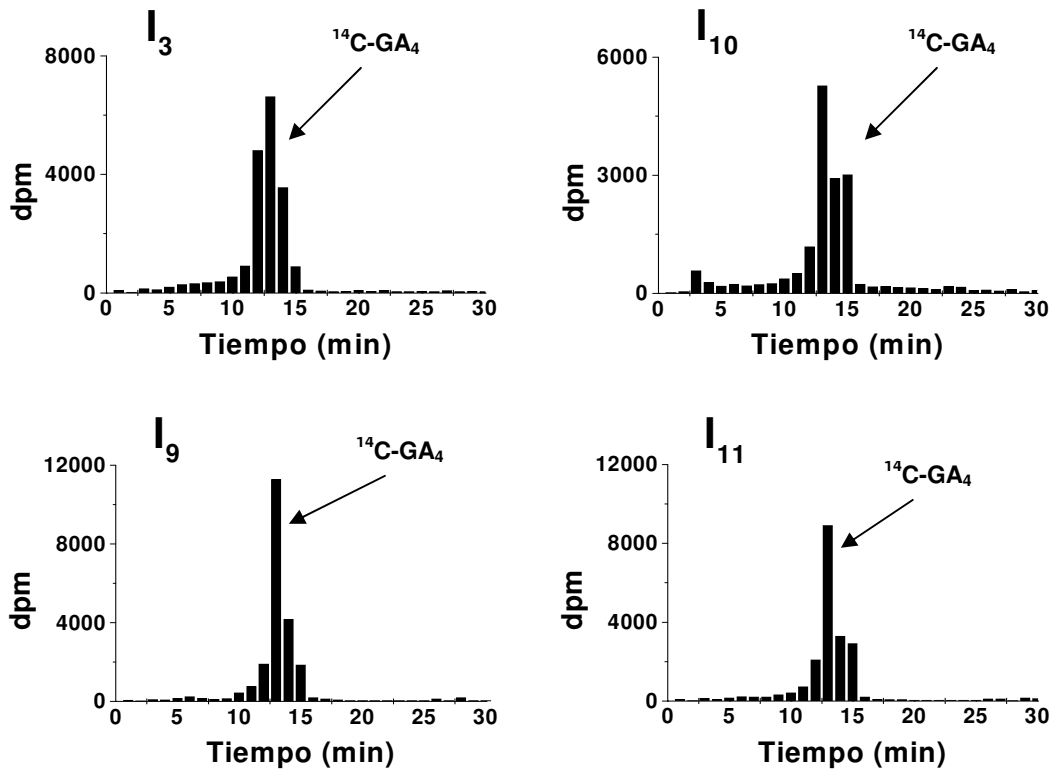
Con el objeto de comparar la capacidad de biosintetizar giberelinas de las distintas cepas de *F. konzum*, se incubaron cultivos líquidos con  $^{14}\text{C-GA}_{12}$  aldehído, un precursor temprano que puede generar productos tanto de la vía no hidroxilada como de la  $3\beta$ -hidroxilada (Fig. 1). Después de 2,5 días de incubación a  $28^\circ\text{C}$  se aislaron los productos marcados y se identificaron por HPLC (Fig. 3). Las cepas  $I_3$  e  $I_{11}$  metabolizaron completamente al  $^{14}\text{C-GA}_{12}$  aldehído dando uno o más productos que presentan los tiempos de retención de las GAs  $3\beta$ -hidroxiladas  $^{14}\text{C-GA}_{14}$  o  $^{14}\text{C-GA}_4$  (13 min y 14 min). Además se detectaron niveles muy bajos de GAs 3,13-hidroxiladas ( $^{14}\text{C-GA}_1$  o  $^{14}\text{C-GA}_3$ ) (Tr 7-8 min) lo que evidencia que aunque las reacciones de 13-hidroxilación y/o de desaturación están presentes en estas cepas, son lentas o limitantes. Las cepas  $I_9$  e  $I_{10}$  presentaron distintos comportamientos: la cepa  $I_9$  metabolizó parcialmente al  $^{14}\text{C-GA}_{12}$  aldehído (Fig. 3) en tanto que la cepa  $I_{10}$  generó productos radiactivos que corresponderían a oxidaciones inespecíficas por oxidasas de otras vías metabólicas. Esta última correspondería a una cepa que no produce GAs (Malonek et al., 2005). Estos resultados apoyan las observaciones descritas en la sección anterior en cuanto a la variabilidad que presenta *F. konzum* con respecto a la biosíntesis de GAs.

A diferencia del  $^{14}\text{C-GA}_{12}$  aldehído, la giberelina lactónica  $^{14}\text{C-GA}_4$ , precursora de los productos finales  $\text{GA}_3$  y  $\text{GA}_1$  (Fig. 1) no fue transformada por ninguna de las cepas de *F. konzum* ensayadas (Fig. 4). Esto podría deberse a que la reacción de 13-hidroxilación es lenta o bien a que las condiciones de incubación utilizadas, particularmente el pH del medio, no son las adecuadas. Se ha descrito, en la mutante B1-41a de *F. fujikuroi*, que algunos precursores  $3\beta$ -hidroxilados, como el  $\text{GA}_{14}$ , agregados exógenamente al cultivo se metabolizan sólo a valores de pH inferiores a 4,0 (Bearder et al, 1975). El efecto del pH sobre la metabolización de  $^{14}\text{C-GA}_4$  se investigó con la cepa  $I_3$  que produce  $\text{GA}_1$  y  $\text{GA}_3$  como productos finales, y se describe más adelante (sección 3.3).





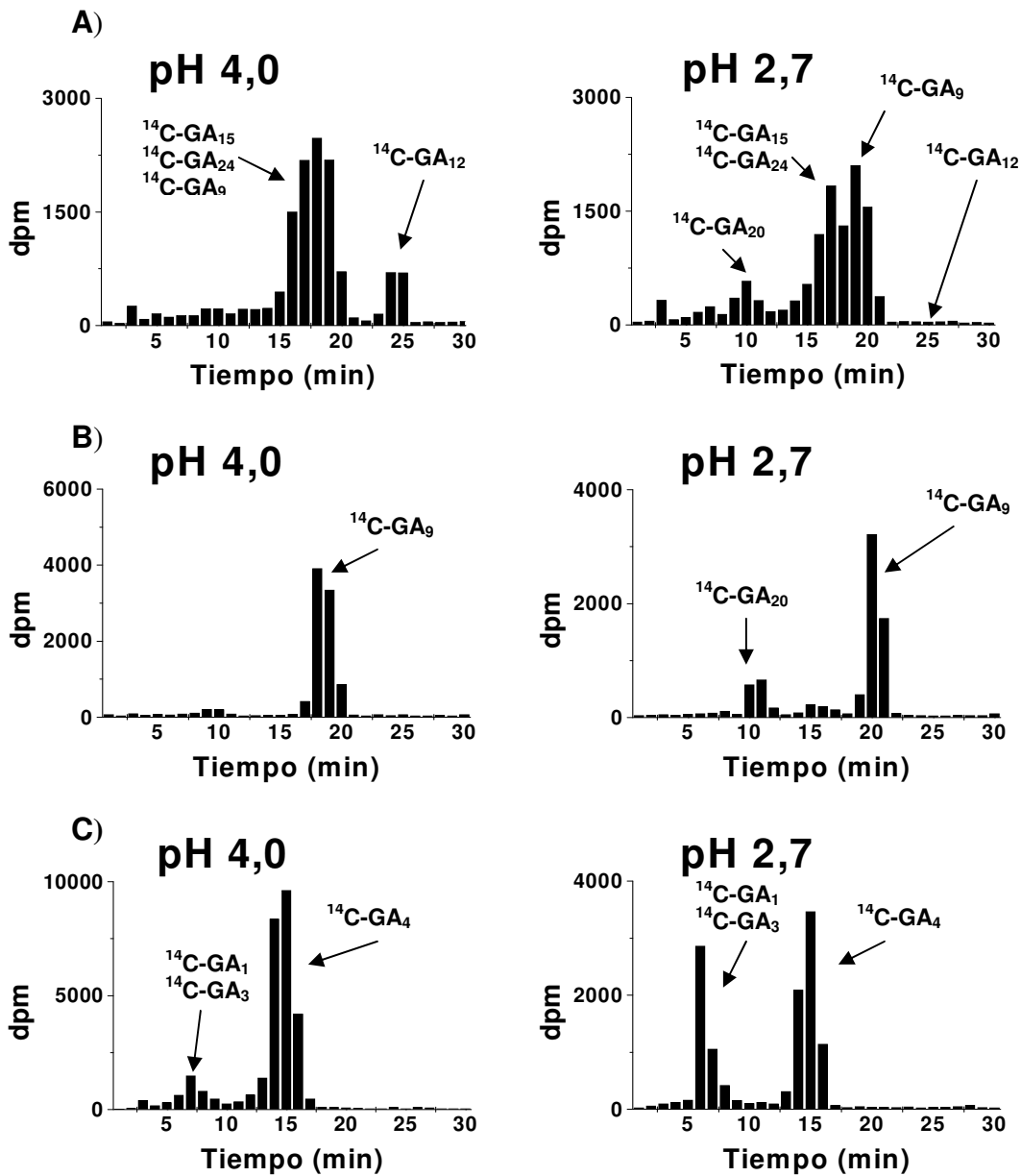
**Figura 3.** Perfiles de HPLC de los productos de metabolización de <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> aldehído por distintas cepas de *F. konzum*. El tiempo de retención del <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> aldehído es 25 min.



**Figura 4.** Perfiles de HPLC de los productos de metabolización de <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> por distintas cepas de *F. konzum*. El tiempo de retención del <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> es 13 min.

### 3.3 Efecto del pH y del nitrato de amonio sobre la actividad de monooxigenasas de giberelinas

Se investigó en la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum* si el pH del medio de cultivo influye en la metabolización de los precursores de GAs. Con este fin se incubaron los precursores no hidroxilados <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> ó <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> así como el precursor 3β-hidroxilado <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> en un medio sin nitrógeno ajustado a pH 4,0 ó a pH 2,7. Los resultados se muestran en la Figura 5. El sustrato <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> fue metabolizado completamente en el medio ajustado a pH 2,7 mientras que en el medio a pH 4,0 quedó un 10% de sustrato remanente después de la incubación (Fig. 5A). Los productos formados corresponden a <sup>14</sup>C-GA<sub>15</sub> y <sup>14</sup>C-GA<sub>24</sub> que resultan de la oxidación del metilo 20 hasta alcohol o aldehído por acción de la monooxigenasa P450-2, junto con <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> que resulta de la oxidación hasta CO<sub>2</sub> (Tudzynski et al, 2002; Troncoso et al., 2008). Se observó además que a pH 2,7 se forma un producto que presenta un tiempo de retención de 10 minutos, correspondiente a la GA 13-hidroxilada <sup>14</sup>C-GA<sub>20</sub>. Ésta se formaría partir del producto no hidroxilado <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub>. A pH 2,7 el metilo 20 se oxida hasta CO<sub>2</sub> a diferencia de la incubación a pH 4,0 en que éste se oxidaría principalmente hasta estados de oxidación intermedios (alcohol o aldehído). A diferencia de <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub>, el sustrato <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> no fue transformado en el medio a pH 4,0 mientras que a pH 2,7 se metabolizó parcialmente (8%) a un producto con el tiempo de retención de <sup>14</sup>C-GA<sub>20</sub>. La baja transformación de GA<sub>9</sub> indica que no es un buen sustrato de la 13-hidroxilasa (Fig. 5B). Por último, se encontró que el sustrato lactónico 3β-hidroxilado <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> prácticamente no se transformó (3%) a pH 4,0 mientras que a pH 2,7 se obtuvo un 40% de conversión a los productos <sup>14</sup>C-GA<sub>1</sub> y <sup>14</sup>C-GA<sub>3</sub> por acción de la 13-hidroxilasa y la desaturasa (Fig. 5C). En resumen, para todos los sustratos anteriores el pH influye significativamente en su metabolización, especialmente para los sustratos de las etapas finales de la vía de síntesis de GAs que son más polares. Probablemente a pH 2,7 se facilitaría el ingreso al micelio de las <sup>14</sup>C-GAs agregadas externamente (Bearder et al., 1975) aunque también el pH podría alterar la actividad catalítica de las distintas enzimas.



**Figura 5.** Perfiles de HPLC de los productos obtenidos de la incubación de cultivos de *F. konzum* con A)  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>12</sub>; B)  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>9</sub>; C)  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>4</sub>, en medios a pH 4,0 ó 2,7. Los Tr de GA<sub>12</sub>, GA<sub>9</sub> y GA<sub>4</sub> son 24 min, 20 min y 14 min respectivamente.

Además del efecto de pH se investigó si la presencia de fuentes nitrogenadas en el medio de cultivo afecta la velocidad de utilización de los distintos sustratos de las monooxigenasas de GAs. Para ésto se cultivó la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum* en medios con NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (1,92 g/L; 40% ICI, pH 2,7) o bien sin

$\text{NH}_4\text{NO}_3$  (0% ICI, pH 2,7), a los que se administró  $^{14}\text{C-GA}_{12}$  o  $^{14}\text{C-GA}_4$  para investigar su metabolización. Los cultivos se mantuvieron por tiempos variables (entre 0-7 días) en el medio sin nitrógeno antes de agregar el precursor radiactivo (Tablas 3 y 4) para investigar si existe inducción de las oxidasas de GAs en ausencia de compuestos nitrogenados como se ha descrito para *F. fujikuroi* (Tudzynski et al., 1999). Se aislaron los productos y el sustrato remanente después de 16 y 24 h de incubación con los precursores y se determinó la velocidad de oxidación de los dos sustratos.

**Tabla 3.** Efecto del  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sobre la utilización de  $^{14}\text{C-GA}_{12}$  por *F. konzum* (cepa I<sub>3</sub>).

<b>[<math>\text{NH}_4\text{NO}_3</math>] (g/L)</b>	<b>Tiempo de Pre- incubación (días)*</b>	<b>Velocidad (dpm/h/mg micelio)</b>
<b>1,92</b>	<b>0</b>	<b>13,7</b>
<b>0</b>	<b>0</b>	<b>17,5</b>
<b>0</b>	<b>1</b>	<b>21,2</b>
<b>0</b>	<b>7</b>	<b>23,7</b>

\* Tiempo que se mantuvo el micelio en el medio señalado, previo a la adición del sustrato  $^{14}\text{C-GA}_{12}$  (20.000 dpm). Una vez agregado el sustrato, el cultivo se incubó por 16 y 24 horas a 28°C, y se aislaron los productos para determinar la velocidad.

**Tabla 4.** Velocidad de utilización de  $^{14}\text{C-GA}_4$  por la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum* en un medio de cultivo sin compuestos nitrogenados.

<b>Tiempo de Pre-incubación (días)*</b>	<b>Velocidad (dpm/h/mg micelio)</b>
<b>0</b>	<b>0</b>
<b>1</b>	<b>3,2</b>
<b>7</b>	<b>2.4</b>

\* Tiempo que se mantuvo el micelio en 0% ICI a pH 2,7 (ver Métodos), previo a la adición del sustrato  $^{14}\text{C-GA}_4$  (30.000 dpm). Una vez agregado el sustrato, el cultivo se incubó por 16 y 24 horas a 28°C, y se aislaron los productos para determinar la velocidad.

La velocidad de oxidación de  $^{14}\text{C-GA}_{12}$  fue de 13,7 dpm/h/mg de micelio en el medio con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y aumentó 1,7 veces (hasta 23,7 dpm/h/mg de micelio)

después de 7 días de preincubación en un medio sin nitrógeno (Tabla 3). Se obtuvo un menor aumento con tiempos de preincubación de 0 ó 1 día. El aumento en la velocidad reflejaría la inducción de la C20 oxidasa en ausencia de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  sugiriendo que en *F. konzum* la biosíntesis de GAs estaría reprimida por compuestos nitrogenados aunque en menor grado que en *F. fujikuroi* (Mihlan et al., 2003).

La Tabla 4 muestra la utilización de  $^{14}\text{C-GA}_4$  por la cepa  $I_3$ , luego de distintos tiempos de pre-incubación en un medio sin fuentes de nitrógeno. Sin pre-incubación, no se obtuvo transformación del sustrato en tanto que con 1 ó 7 días de pre-incubación se obtuvo una pequeña metabolización, un orden de magnitud menor a la obtenida con  $^{14}\text{C-GA}_{12}$ . El tiempo de preincubación no alteró significativamente la velocidad de oxidación de  $^{14}\text{C-GA}_4$  lo que indica que la reacción de 13-hidroxilación es lenta en *F. konzum* y no se induce significativamente en un medio carente de nitrógeno. Esto es similar a lo descrito para *F. fujikuroi* en que la 13-hidroxilasa es la única enzima de la biosíntesis de GAs que no presenta regulación por nitrógeno (Mihlan et al., 2003).

### **3.4 Caracterización bioquímica de la cepa productora de GAs $I_3$ de *F. konzum***

Se llevaron a cabo una serie de experimentos destinados a caracterizar la biosíntesis de GAs en la cepa  $I_3$  de *F. konzum*. Por una parte se identificaron los productos de oxidación de distintos precursores de GAs agregados al cultivo y además se determinó la eficiencia de las monooxigenasas de GAs comparándolas con las de la cepa silvestre ACC917 de *F. fujikuroi*. Esta cepa presenta un patrón de GAs endógenas similar al de IMI 58285. Finalmente se determinó en microsomas del micelio el requerimiento de cofactores para algunas de las reacciones de oxidación.

#### **3.4a Productos de metabolización de precursores derivados del *ent*-kaureno y del *ent*-giberelano**

Se administró, a cultivos de la cepa  $I_3$  de *F. konzum*, ajustados a pH 2,7 y en presencia de AMO 1618 (inhibidor de la *ent*-kaureno oxidasa), ácido  $^{14}\text{C-ent}$ -

kaurenoico,  $^{14}\text{C-GA}_{12}$  aldehído,  $^{14}\text{C-GA}_{12}$ ,  $^{14}\text{C-GA}_4$ ,  $^{14}\text{C-GA}_9$  o  $^{14}\text{C-GA}_{20}$ . Después de 2,5 días de incubación se aislaron las GAs marcadas desde el medio de cultivo, y se identificaron mediante GC-MS y/o HPLC (Tabla 5).

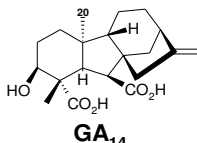
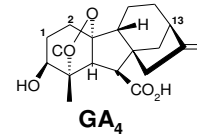
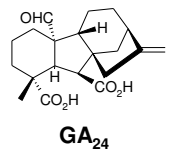
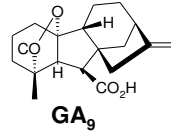
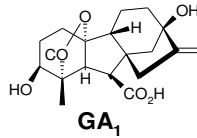
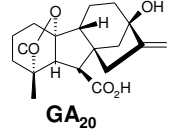
El ácido  $^{14}\text{C-ent-kaurenoico}$  generó principalmente productos  $3\beta$  hidroxilados (70%), y sólo una baja proporción de productos no-hidroxilados ( $\cong 6\%$ ) (Tabla 5). Los productos principales corresponden a los intermediarios de la vía  $3\beta$ -hidroxilada:  $^{14}\text{C-GA}_{14}$ , giberelina de 20C, y  $^{14}\text{C-GA}_4$ , lactona que se genera desde  $\text{GA}_{14}$  por oxidación del C20 hasta  $\text{CO}_2$  (Fig. 1) También se formó ácido  $7\alpha\text{OH ent-}^{14}\text{C-kaurenoico}$ , un producto de la monooxigenasa P450-1, intermediario en la síntesis de  $\text{GA}_{14}$  (Fig. 1), y un 14% de los productos  $3,13$ -hidroxilados  $^{14}\text{C-GA}_1$  y/o  $^{14}\text{C-GA}_3$  que son los productos finales de la secuencia. Esto indica que la vía  $3\beta$ -hidroxilada de síntesis de GAs es la principal en *F. konzum*, aunque la cantidad de GAs no-hidroxiladas formadas en *F. konzum* es mayor que en *F. fujikuroi*, en que prácticamente no se acumula  $\text{GA}_{12}$  o  $\text{GA}_9$  en el cultivo (Tabla 1).

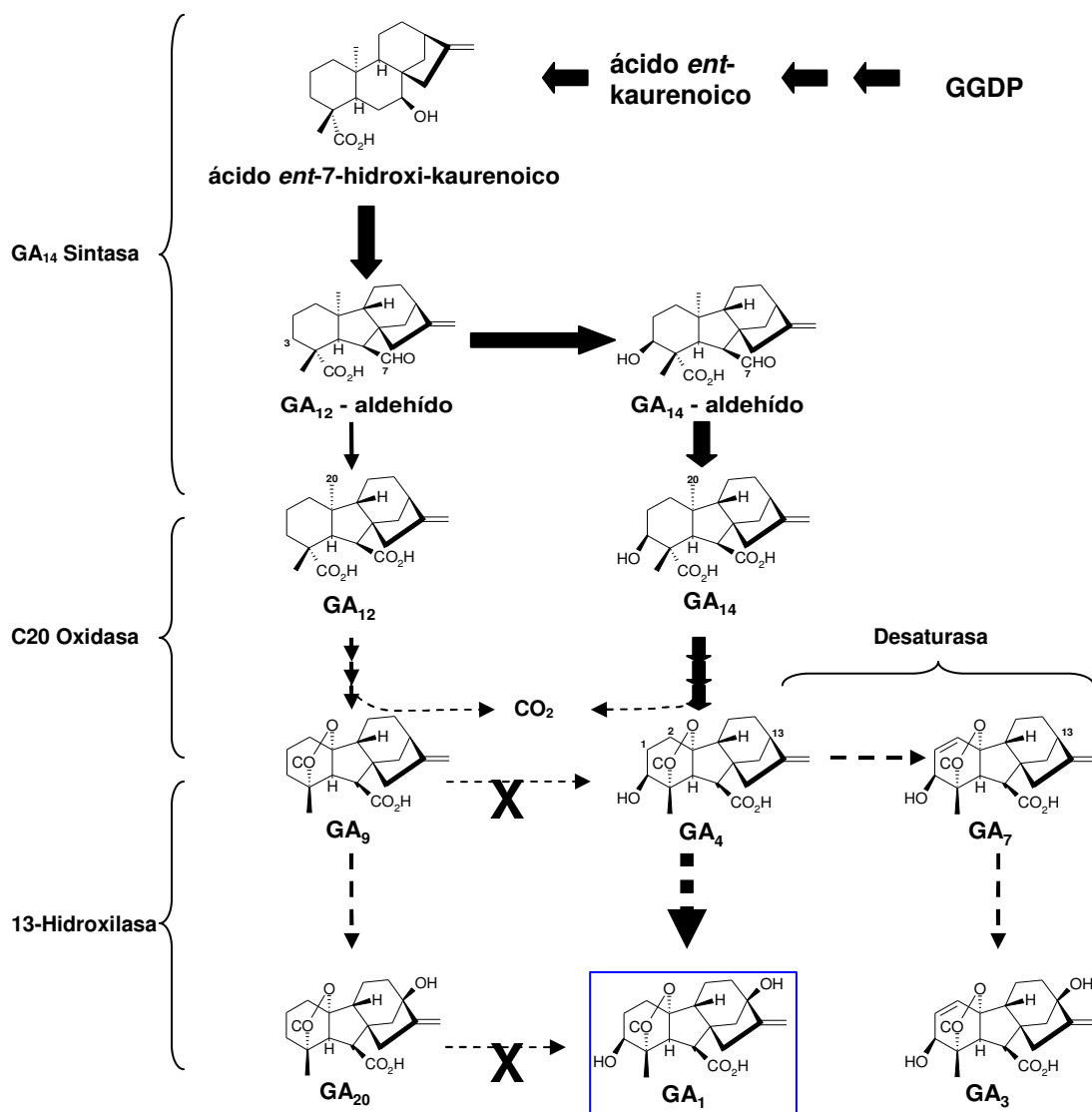
Con respecto al  $^{14}\text{C-GA}_{12}$  aldehído, éste fue transformado por la cepa  $\text{I}_3$  en productos  $3\beta$ -hidroxilados (91%) y no-hidroxilados (7,7%). Los intermediarios  $^{14}\text{C-GA}_{14}$  y  $^{14}\text{C-GA}_4$  se acumularon en el cultivo lo que indica que las etapas finales de la biosíntesis de  $\text{GA}_1$  y de  $\text{GA}_3$  son lentas en *F. konzum*. El precursor  $^{14}\text{C-GA}_{12}$ , fue transformado principalmente a productos de oxidación intermedia del metilo 20,  $^{14}\text{C-GA}_{15}$  (C20 alcohol) y  $^{14}\text{C-GA}_{24}$  (C20 aldehído) (48% en total). Se obtuvo una importante cantidad de  $^{14}\text{C-GA}_9$  (38%) quedando sin transformar un 14% del sustrato inicial.

No se observó transformación hacia productos  $3\beta$  hidroxilados, lo que permite concluir que la reacción de hidroxilación en  $3\beta$  ocurre a un nivel anterior a  $\text{GA}_{12}$  en *F. konzum*, sobre el  $\text{GA}_{12}$  aldehído.

En la Figura 6 se muestra la vía de síntesis de GAs propuesta para la cepa  $\text{I}_3$  de *F. konzum*, a partir de los datos obtenidos en los experimentos realizados.

**Tabla 5.** Productos de metabolización de precursores de GAs, *ent*-kaurenoides o derivados del *ent*-giberelano, por cultivos de *F. konzum* (cepa I<sub>3</sub>).

SUSTRATO (% remanente)	PRODUCTOS (%)	Método de identificación	ESTRUCTURAS
<b>ác.<sup>14</sup>C-<i>ent</i>- kaurenico</b>	<sup>14</sup> C-GA <sub>1</sub> / <sup>14</sup> C-GA <sub>3</sub> (14%) <sup>14</sup> C-GA <sub>14</sub> / <sup>14</sup> C-GA <sub>4</sub> (56%) ác.7αOH- <i>ent</i> - <sup>14</sup> Ckaurenico (23%) <sup>14</sup> C-GA <sub>12</sub> (6%)	HPLC	 <b>GA<sub>14</sub></b>
<b><sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> aldehido (1%)</b>	<sup>14</sup> C-GA <sub>3</sub> / <sup>14</sup> C-GA <sub>1</sub> (22 %) <sup>14</sup> C-GA <sub>14</sub> / <sup>14</sup> C-GA <sub>4</sub> (69%) <sup>14</sup> C-GA <sub>9</sub> (7 %)	HPLC	 <b>GA<sub>4</sub></b>
<b><sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> (14%)</b>	<sup>14</sup> C-GA <sub>24</sub> / <sup>14</sup> C-GA <sub>25</sub> / <sup>14</sup> C-GA <sub>15</sub> (48%) <sup>14</sup> C-GA <sub>9</sub> (38%)	GC/MS HPLC	 <b>GA<sub>24</sub></b>
<b><sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> (80%)</b>	<sup>14</sup> C-GA <sub>20</sub> (20 %)	HPLC	 <b>GA<sub>9</sub></b>
<b><sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> (52 %)</b>	<sup>14</sup> C-GA <sub>1</sub> / <sup>14</sup> C-GA <sub>3</sub> (38%) <sup>14</sup> C-GA <sub>7</sub> (10 %)	GC/MS HPLC	 <b>GA<sub>1</sub></b>
<b><sup>14</sup>C-GA<sub>20</sub> (100%)</b>	—	GC/MS	 <b>GA<sub>20</sub></b>



**Figura 6.** Secuencia de biosíntesis de GAs propuesta para *F. konzum*. Se encuentra enmarcado el producto final GA<sub>1</sub> (azul). Se indica la vía principal mediante flechas gruesas. Las flechas punteadas indican reacciones lentas. Se indican además las enzimas que catalizan cada paso de la vía.

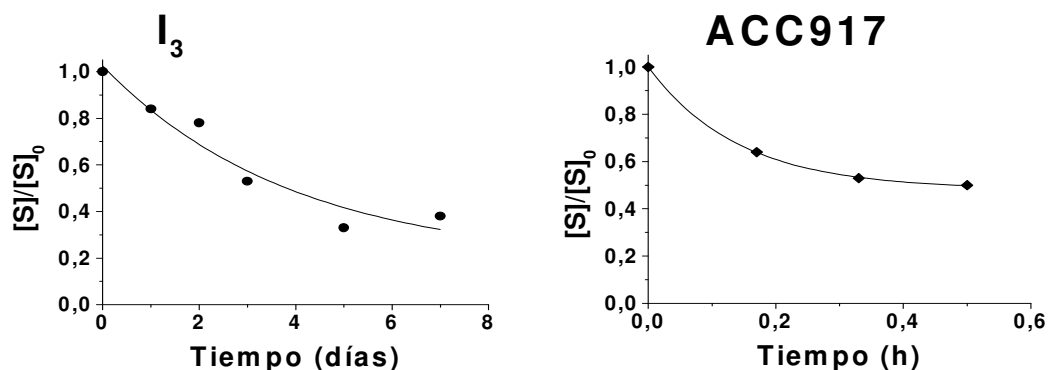
La detección de altos niveles de intermediarios de oxidación del C20 indica que la C20 oxidasa de *F. konzum* presenta una baja eficiencia catalítica. Además de los sustratos de 20 carbonos, se investigó la utilización por la cepa I<sub>3</sub>, de las GAs lactónicas (C19): <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> (no hidroxilada), <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> (3β-hidroxilada) y <sup>14</sup>C-GA<sub>20</sub> (13- hidroxilada). <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> se convirtió en un 20% en <sup>14</sup>C-GA<sub>20</sub> por acción de la 13-hidroxilasa lo que concuerda con el análisis de GAs endógenas de distintas cepas de *F. konzum* que incluye GA<sub>20</sub> como producto (sección 3.1). Este es un



producto final y no sufre posteriores transformaciones ya que  $^{14}\text{C-GA}_{20}$  agregado a los cultivos fue recuperado intacto después de 2,5 días de incubación (Tabla 5). La GA  $3\beta$ -hidroxilada  $^{14}\text{C-GA}_4$  fue convertida en  $^{14}\text{C-GA}_1$  y  $^{14}\text{C-GA}_3$  (38% en total) junto con un pequeño porcentaje de  $^{14}\text{C-GA}_7$  por acción de la desaturasa. Los experimentos de metabolización de GAs lactónicas indican que los productos 3,13-hidroxilados  $\text{GA}_1$  y  $\text{GA}_3$  se originarían desde el precursor  $3\beta$ -hidroxilado.

### 3.4b Reacciones de oxidación en C7 e hidroxilación en C3 en *F. konzum* y en *F. fujikuroi*.

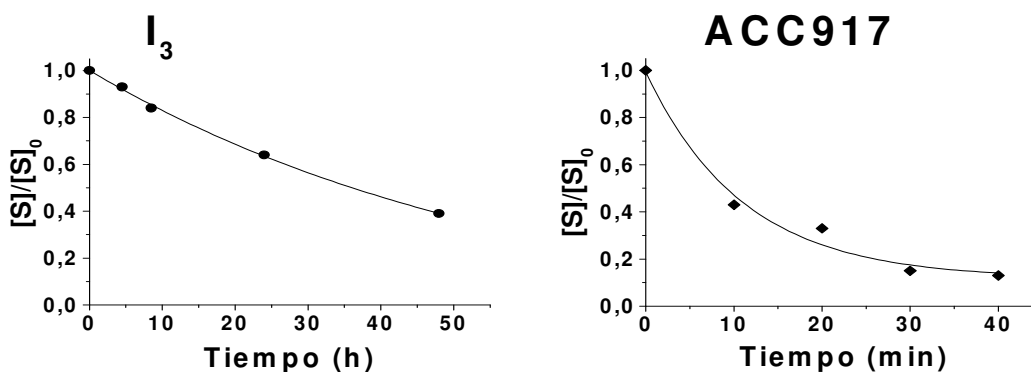
Con el objeto de averiguar la eficiencia de las reacciones de oxidación en C7 y de hidroxilación en C3 catalizadas por la  $\text{GA}_{14}$  sintasa de *F. konzum*, se investigó la cinética de utilización de ácido  $^{14}\text{C-ent-kaurenoico}$  por cultivos de la cepa  $\text{I}_3$  y por la cepa ACC917 de *F. fujikuroi* en un medio sin nitrógeno para inducir la síntesis de GAs. A distintos tiempos de incubación se cuantificaron los productos y el sustrato remanente por HPLC (Fig. 7). Después de 30 min. de incubación la cepa ACC917 transformó en productos la mitad del sustrato mientras que con la cepa  $\text{I}_3$  se obtuvo un 50% de conversión después de 3 días de incubación (Fig. 7). Esto indica que la  $\text{GA}_{14}$  sintasa de *F. fujikuroi* y de *F. konzum* presentan grandes diferencias en su eficiencia, presentando esta última una baja eficiencia.



**Figura 7.** Cinética de utilización de ácido *ent*- $^{14}\text{C}$ -kaurenoico por cultivos de *F. konzum* (cepa  $\text{I}_3$ ) y de *F. fujikuroi* (cepa ACC917). El sustrato inicial  $[\text{S}]_0$  corresponde a 14.000 dpm.

### 3.4c Oxidación del metilo 20 en *F. konzum* y en *F. fujikuroi*

Los cultivos de la cepa I<sub>3</sub> y de la cepa ACC917, en un medio sin nitrógeno y a pH 2,7, fueron incubados con <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> (14.000 dpm/10mg de micelio) para investigar la velocidad de oxidación del C20. La curva de progreso de la reacción muestra que con la cepa ACC917 se oxidó un 50% del sustrato a los 10 min. a diferencia de la cepa I<sub>3</sub> que generó un 50% de producto en 1,5 días (Fig. 8). Estos resultados indican que la oxidación del C20 es más lenta en *F. konzum* lo que explica la obtención de productos parcialmente oxidados, C20 alcohol y C20 aldehído (Tabla 2, Tabla 5).

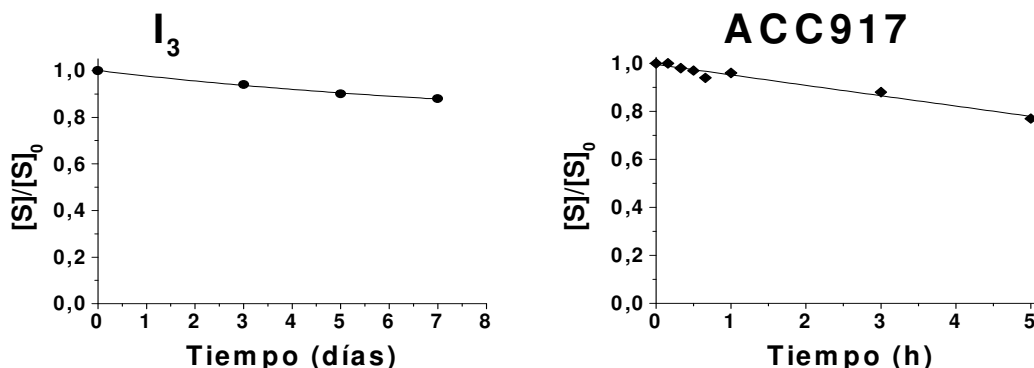


**Figura 8.** Cinética de utilización de <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> por cultivos de *F. konzum* (cepa I<sub>3</sub>) y de *F. fujikuroi* (cepa ACC917). El sustrato inicial [S]<sub>0</sub> corresponde a 14.000 dpm.

### 3.4d Reacciones de desaturación y de hidroxilación en C13 en *F. konzum* y en *F. fujikuroi*.

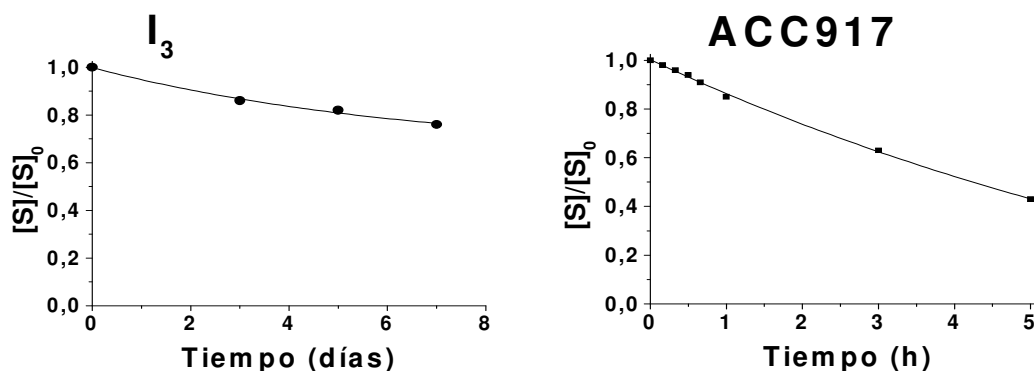
Siguiendo el procedimiento anterior se investigó la cinética de utilización de <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> para determinar la velocidad de las reacciones de desaturación y/o de hidroxilación en C13 en *F. konzum* y en *F. fujikuroi*. Los productos y el sustrato remanente se cuantificaron a distintos tiempos en alícuotas del cultivo en un rango entre 10% y 40% de sustrato transformado para obtener las velocidades respectivas (Fig. 9). Los cultivos de ACC917 transformaron en 5 h un 20% del sustrato en el producto <sup>14</sup>C-GA<sub>3</sub> en tanto que los cultivos de la cepa I<sub>3</sub> metabolizaron un 12% del sustrato a los 7 días de incubación. Estos resultados indican que la 13-hidroxilasa de *F. konzum* presenta una eficiencia catalítica reducida con respecto a la 13-hidroxilasa de *F. fujikuroi*. En este ensayo, debido al

método de análisis utilizado (HPLC) sólo se detecta la reacción de hidroxilación en C13 para dar GA<sub>1</sub> o GA<sub>3</sub>. En *F. konzum* los productos son una mezcla de las dos lactonas (GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub>; Tabla 5) en cambio en *F. fujikuroi* se forma exclusivamente GA<sub>3</sub> (Malonek et al., 2005).



**Figura 9.** Cinética de utilización de <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> por cultivos de *F. fujikuroi* (cepa ACC917) y de *F. konzum* (cepa I<sub>3</sub>). El sustrato inicial [S]<sub>0</sub> corresponde a 14.000 dpm.

Finalmente se investigó la cinética de metabolización de <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> (lactona no hidroxilada) que corresponde a la reacción de hidroxilación en C13 por las cepas de ambas especies (Fig. 10).



**Figura 10.** Cinética de utilización de <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> por cultivos de *F. konzum* (cepa I<sub>3</sub>) y de *F. fujikuroi* (cepa ACC917). El sustrato inicial [S]<sub>0</sub> corresponde a 14.000 dpm.

<sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> fue convertido eficientemente en <sup>14</sup>C-GA<sub>20</sub> por los cultivos de *F. fujikuroi* (20% de conversión en 1 h) mientras que la misma transformación se obtuvo con los cultivos de *F. konzum* en 4,5 días (Fig.10). Esto confirma que la 13-

hidroxilasa de *F. fujikuroi* utiliza la lactona no hidroxilada con una mayor eficiencia que la 13-hidroxilasa de *F. konzum*. Esta enzima, que también hidroxila al  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>4</sub>, catalizaría en *F. konzum* la etapa limitante de la biosíntesis de GA<sub>1</sub> ó de GA<sub>3</sub>.

### **3.4e. Velocidad de las reacciones catalizadas por monooxigenasas de giberelinas (GA<sub>14</sub> sintasa, C20 oxidasa y 13-hidroxilasa) en *F. konzum* y en *F. fujikuroi***

Se calcularon las velocidades de utilización de sustrato para la GA<sub>14</sub> sintasa, la C20 oxidasa y la 13-hidroxilasa de GAs a partir de las curvas de progreso en las Figuras 7-10. Las pendientes iniciales se expresaron en dpm de sustrato transformado por hora y se normalizaron por mg de micelio, obteniéndose los datos de velocidad que se resumen en la Tabla 6.

Todas las reacciones investigadas son más lentas en *F. konzum*. La mayor diferencia relativa se encuentra en las reacciones de oxidación en C7 e hidroxilación en C3. La velocidad de utilización del ácido *ent*- $^{14}\text{C}$ -kaurenoico en cultivos de la cepa ACC917 fue 397 veces mayor que en la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum*. Para ACC917 el principal producto es GA<sub>14</sub> por lo que la velocidad incluye ambas reacciones. Para I<sub>3</sub> el principal producto es el ácido 7 $\alpha$ -OH-*ent*-kaurenoico por lo que la velocidad corresponde mas bien la reacción de oxidación en C7. La reacción de oxidación del metilo 20 fue 216 veces mayor en la cepa ACC917 de *F. fujikuroi* en la que GA<sub>12</sub> genera principalmente el producto lactónico por oxidación hasta CO<sub>2</sub>. La reacción más lenta de la secuencia metabólica en ambas especies fue la 13-hidroxilación tanto de  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>4</sub> como de  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>9</sub>. La velocidad de utilización de ambos sustratos es mayor en ACC917 que en I<sub>3</sub> (48 y 62 veces respectivamente) pero es siempre la velocidad menor de la secuencia. Todas las reacciones de monooxigenasas presentan velocidades reducidas en la cepa I<sub>3</sub> por lo que se podría postular que hay algún factor común que las estaría afectando. Una deficiencia en el suministro de electrones por parte de las proteínas transportadoras asociadas a las monooxigenasas podría dar cuenta de esta observación (Troncoso et al, 2008).

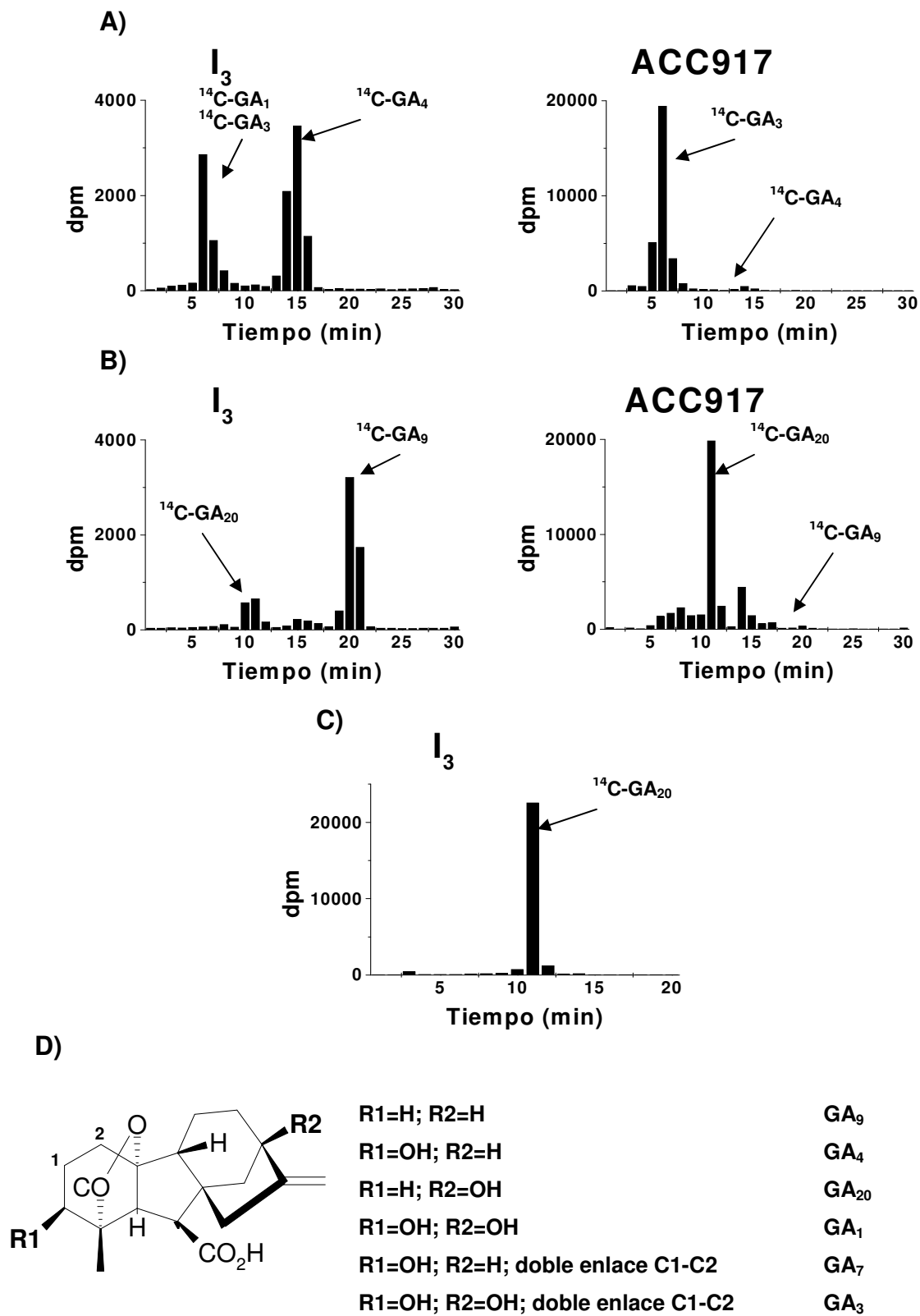
**Tabla 6.** Velocidad de las reacciones catalizadas por las monooxigenasas P450-1, P450-2 y P450-3 en *F. konzum* y en *F. fujikuroi*.

<b>CEPA/Sustrato</b>	<b>Reacciones ensayadas</b>	<b>Oxidasa</b>	<b>Velocidad (dpm/h/mg de micelio)</b>	<b>Velocidad relativa</b>
<b>I<sub>3</sub> (<i>F. konzum</i>)/ ác. ent-<sup>14</sup>C- kaurenico</b>	<b>Oxidación en C7 Hidroxilación en C3</b>	<b>GA<sub>14</sub> sintetasa (MO P450-1)</b>	<b>3,73</b>	<b>1</b>
<b>ACC917 (<i>F. fujikuroi</i>)/ ác. ent-<sup>14</sup>C- kaurenico</b>	<b>Oxidación en C7 Hidroxilación en C3</b>	<b>GA<sub>14</sub> sintetasa (MO P450-1)</b>	<b>1482</b>	<b>397</b>
<b>I<sub>3</sub> (<i>F. konzum</i>)/ <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub></b>	<b>Oxidación del metilo 20</b>	<b>C20 oxidasa (MO P450-2)</b>	<b>14,5</b>	<b>1</b>
<b>ACC917 (<i>F. fujikuroi</i>)/ <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub></b>	<b>Oxidación del metilo 20</b>	<b>C20 oxidasa (MO P450-2)</b>	<b>3129</b>	<b>216</b>
<b>I<sub>3</sub> (<i>F. konzum</i>)/ <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub></b>	<b>Desaturación en 1,2 Hidroxilación en C13</b>	<b>Desaturasa 13- hidroxilasa (MO P450-3)</b>	<b>0,78</b>	<b>1</b>
<b>ACC917 (<i>F. fujikuroi</i>)/ <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub></b>	<b>Desaturación en 1,2 Hidroxilación en C13</b>	<b>Desaturasa 13- hidroxilasa (MO P450-3)</b>	<b>37,3</b>	<b>48</b>
<b>I<sub>3</sub> (<i>F. konzum</i>)/ <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub></b>	<b>Hidroxilación en C13</b>	<b>Desaturasa 13- hidroxilasa (MO P450-3)</b>	<b>1,81</b>	<b>1</b>
<b>ACC917 (<i>F. fujikuroi</i>)/ <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub></b>	<b>Hidroxilación en C13</b>	<b>Desaturasa 13- hidroxilasa (MO P450-3)</b>	<b>113</b>	<b>62</b>

### 3.5. Origen biosintético de las giberelinas GA<sub>1</sub> y GA<sub>3</sub>. Metabolismo de las GAs lactónicas <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub>, <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> y <sup>14</sup>C-GA<sub>20</sub>.

Según datos de la literatura y según los resultados obtenidos en este trabajo, *F. konzum* produce principalmente GA<sub>1</sub> junto con una menor cantidad de GA<sub>3</sub> (Malonek et al. 2005c). Esto difiere de *F. fujikuroi*, cuyo producto mayoritario es GA<sub>3</sub>, sin que se sinteticen otras GAs en cantidades importantes. Por otra parte, en *F. konzum* la vía no-hidroxilada tiene una mayor participación que en *F. fujikuroi*, por lo cual el producto lactónico no hidroxilado (GA<sub>9</sub>) podría contribuir a generar el producto final GA<sub>1</sub> (3,13-hidroxilado) a través de la hidroxilación de GA<sub>20</sub> (lactona 13-hidroxilada) como intermediario (Fig. 6). Esta hipótesis concuerda con la detección en los cultivos de *F. konzum* de la lactona GA<sub>20</sub> que se genera también en las incubaciones con <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> (Fig. 5). Con el objeto de investigar el origen del GA<sub>1</sub> en *F. konzum*, se comparó la metabolización de los precursores <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub>, <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> o <sup>14</sup>C-GA<sub>20</sub> con los obtenidos con cultivos de ACC917 (Fig.11).

El sustrato <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> fue transformado por la cepa ACC917 completamente en <sup>14</sup>C-GA<sub>3</sub> en tanto que <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> no generó este producto de oxidación sino que se transformó en <sup>14</sup>C-GA<sub>20</sub>. Este último producto (13-hidroxilado) no se convirtió en <sup>14</sup>C-GA<sub>3</sub> (Tr 7-8 min.). El producto final <sup>14</sup>C-GA<sub>3</sub> por lo tanto se origina en *F. fujikuroi* desde el precursor <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> (Fig. 1). Para la cepa I<sub>3</sub> la lactona 3β-hidroxilada <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> originó <sup>14</sup>C-GA<sub>1</sub> y <sup>14</sup>C-GA<sub>3</sub> (37%), en tanto que la lactona no hidroxilada <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> dio <sup>14</sup>C-GA<sub>20</sub>, este último no se transforma posteriormente y no generó <sup>14</sup>C-GA<sub>1</sub> (Fig. 11). Por lo tanto, el producto final GA<sub>1</sub> se genera en *F. konzum* desde GA<sub>4</sub> por acción de la 13-hidroxilasa y no a través de la hidroxilación en C3 de GA<sub>20</sub> (Fig. 6). Las dos hidroxilasas de GAs (3β-hidroxilasa y 13 hidroxilasa) presentan una distinta especificidad de sustrato: la 3β-hidroxilasa oxida GAs de 20 carbonos, principalmente al GA<sub>12</sub> aldehído y no oxida GAs lactónicas en tanto que la 13-hidroxilasa es específica para GAs lactónicas y oxida GA<sub>4</sub> o GA<sub>9</sub>. Esto es válido tanto para *F. konzum* como para *F. fujikuroi*.



**Figura 11.** Metabolización de giberelinas lactónicas por *F. konzum* y *F. fujikuroi*. En A), metabolización de  $^{14}\text{C-GA}_4$ , en B)  $^{14}\text{C-GA}_9$  y en C)  $^{14}\text{C-GA}_{20}$ . D) Estructuras de giberelinas lactónicas.

### 3. 6 Participación de las vías 3β-hidroxiada y no hidroxiada de la síntesis de GAs.

Por medio de centrifugación sucesiva de un homogenizado del micelio a 10.000xg y a 100.000xg se obtuvieron fracciones microsomales de la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum*. Estas fracciones fueron analizadas funcionalmente con respecto a las reacciones de oxidación del <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> aldehído, intermediario sobre el que se produce la ramificación de la secuencia metabólica hacia la vía 3β-hidroxiada o la vía no hidroxiada (Fig. 1). Particularmente, se buscó averiguar si las fracciones microsomales eran activas y esclarecer la participación que tienen las vías 3β hidroxiada y no-3β hidroxiada en *F. konzum* a través de la identificación por HPLC de los productos (<sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> no hidroxiado o <sup>14</sup>C-GA<sub>14</sub> 3β-hidroxiado). Los resultados se compararon con los obtenidos con fracciones microsomales de *F. fujikuroi*, ensayadas bajo las mismas condiciones (Tabla 7).

Los microsomas de *F. konzum* transformaron al <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> aldehído en dos productos: <sup>14</sup>C-GA<sub>14</sub> y <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> cuando se agregó al medio de reacción NADPH como reductor. Esta transformación es activada por FAD (Tabla 7). Estos mismos productos se detectaron con microsomas de *F. fujikuroi* pero la reacción es más lenta con los microsomas de *F. konzum* (30-40% de producto en 1 h de incubación comparado con 100% de conversión en *F. fujikuroi*). Además ambos sistemas difieren en la naturaleza del producto principal. Los microsomas de *F. fujikuroi* generaron un 85% de <sup>14</sup>C-GA<sub>14</sub> por hidroxiación en C3 del <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> aldehído y sólo un 15% de <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub>, que se forma por oxidación en C7. Por el contrario, los microsomas de *F. konzum* generaron un 29% de <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> y sólo un 10% de <sup>14</sup>C-GA<sub>14</sub>. Esto coincide con la detección de productos no hidroxiados en los cultivos de *F. konzum* (Tabla 1).

El mayor porcentaje de GA<sub>12</sub> obtenido con los microsomas podría deberse a la inactivación de la 3β-hidroxiada durante el aislamiento en mayor proporción que la 7-oxidasa. Otra diferencia entre ambos sistemas es la fuente de electrones para la oxidación. A diferencia de *F. fujikuroi* que puede utilizar NADPH o NADH, los microsomas de *F. konzum* sólo oxidan al GA<sub>12</sub> aldehído en presencia de



NADPH. Este sustrato no fue transformado en presencia de NADH como reductor aun a concentraciones altas de FAD (Tabla 7).

**Tabla 7.** Oxidación de  $^{14}\text{C-GA}_{12}$  aldehído por microsomas de *F. konzum* y de *F. fujikuroi*\*.

CEPA	COFACTORES	PRODUCTOS**	(%)**
ACC917 ( <i>F. fujikuroi</i> )	NADPH 10mM FAD 5 $\mu\text{M}$	$^{14}\text{C-GA}_{14}$ $^{14}\text{C-GA}_{12}$	76 12
	NADPH 10mM FAD 50 $\mu\text{M}$	$^{14}\text{C-GA}_{14}$ $^{14}\text{C-GA}_{12}$	85 15
	NADH 10 mM FAD 5 $\mu\text{M}$	$^{14}\text{C-GA}_{12}$	34
	NADH 10 mM FAD 50 $\mu\text{M}$	$^{14}\text{C-GA}_{12}$	69
I <sub>3</sub> ( <i>F. konzum</i> )	NADPH 10mM FAD 5 $\mu\text{M}$	$^{14}\text{C-GA}_{14}$ $^{14}\text{C-GA}_{12}$	8 25
	NADPH 10mM FAD 50 $\mu\text{M}$	$^{14}\text{C-GA}_{14}$ $^{14}\text{C-GA}_{12}$	10 29
	NADH 10 mM FAD 5 $\mu\text{M}$	-----***	0
	NADH 10 mM FAD 50 $\mu\text{M}$	-----***	0

\* La composición del medio de incubación se indica en Métodos con 20.000 dpm de  $^{14}\text{C-GA}_{12}$  aldehído y 20-50  $\mu\text{L}$  de fracción microsomal.

\*\* Analizados por HPLC de acuerdo al tiempo de retención de los estándares respectivos. El porcentaje se calculó tomando como 100% el sustrato remanente mas los productos.

\*\*\* Se recuperó el sustrato no transformado y no se detectaron productos.

## 4. Discusión

*F. konzum* pertenece a un gran complejo taxonómico fúngico denominado *Gibberella fujikuroi* (Malonek *et al*, 2004). De todas las especies de este complejo, solo *F. konzum* y *F. fujikuroi* son capaces de producir GAs, a pesar que las especies restantes poseen los genes de la vía de síntesis de GAs, o al menos parte de ellos. Los resultados de este trabajo demuestran que la biosíntesis de GAs en *F. konzum* presenta importantes diferencias con respecto a *F. fujikuroi*, especie que ha sido caracterizada en detalle. Se encontraron diferencias en cuanto a la naturaleza de las GAs sintetizadas, en la eficiencia de las enzimas y en el efecto inhibitor del nitrato de amonio sobre las oxidasas de GAs. Además se observaron diferencias entre distintas cepas de *F. konzum*, existiendo cepas productoras así como cepas no productoras de GAs.

Las cepas productoras de *F. konzum* forman como producto principal la lactona 3,13-hidroxiada GA<sub>1</sub>, junto a una cantidad menor de GA<sub>3</sub>, mientras que *F. fujikuroi* produce principalmente GA<sub>3</sub>, lactona 3,13-hidroxiada que además posee una insaturación en 1,2 (Tablas 1 y 2). Esto indica que en *F. konzum* la desaturasa presenta una actividad más baja que la 13-hidroxiada, enzimas que compiten sobre el precursor lactónico GA<sub>4</sub> en las etapas finales de la secuencia (Fig. 1). La 13-hidroxiada en *F. konzum* actúa directamente sobre el GA<sub>4</sub> para dar GA<sub>1</sub> en cambio en *F. fujikuroi*, la desaturasa es más activa que la 13-hidroxiada transformando el GA<sub>4</sub> en GA<sub>7</sub>, el que por acción de la 13-hidroxiada da el producto final GA<sub>3</sub> (Fig. 1 y 6). El mismo efecto se ha descrito en la mutante  $\Delta des$  de *F. fujikuroi* que tiene bloqueado el gen de la desaturasa, y que produce exclusivamente GA<sub>1</sub> como producto final (Tudzynski *et al.*, 2003).

Otra diferencia entre ambas especies es que en *F. fujikuroi* prácticamente no se detecta la vía no hidroxiada, mientras que en *F. konzum* se encuentran productos derivados de esta vía en los cultivos, como GA<sub>9</sub> y GA<sub>20</sub>.

Los productos de metabolización de precursores radiactivos agregados en forma exógena a la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum* permitieron deducir las etapas de la biosíntesis de GA<sub>1</sub>. Los precursores ingresan a la célula y alcanzan el retículo

endoplásmico que contiene las enzimas de la síntesis de GAs pero también pueden sufrir transformaciones inespecíficas catalizadas por oxidasas de otras vías metabólicas. De hecho aunque la mayor parte de los productos radiactivos detectados corresponden a la biosíntesis de GAs, se detectaron algunos productos inespecíficos sobre todo con las cepas no productoras. El pH del medio de cultivo es una variable importante para la metabolización de precursores. La velocidad de conversión de GA<sub>12</sub>, GA<sub>4</sub> o GA<sub>9</sub> es mayor a pH 2,7 que a pH 4,0 probablemente debido a que los sustratos son capaces de ingresar a las células al pH más ácido en que están protonados, favoreciendo su transformación (Bearder et al., 1975).

En *F. fujikuroi* la presencia de compuestos nitrogenados en el cultivo reprime fuertemente la síntesis de GAs a nivel de la expresión de los genes (Tudzynsky et al., 1999a y 1999b). Sólo el gen *P450-3*, que codifica para la 13-hidroxilasa, no es afectado en su expresión por la presencia de nitrógeno (Malonek et al. 2005c). En la cepa I<sub>3</sub> de *F. konzum*, a diferencia de *F. fujikuroi*, observamos sólo un ligero efecto del NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> sobre la utilización de <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub>. La velocidad de metabolización de este sustrato aumentó en 1,7 veces en un cultivo mantenido por 7 días en un medio sin nitrógeno, con respecto a un cultivo que contiene NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>. Esto sugiere que en *F. konzum* el mecanismo de regulación por nitrógeno tendría una baja eficiencia lo que reduciría la velocidad de biosíntesis de GAs debido a la baja expresión de los genes.

La secuencia biosintética de GA<sub>1</sub> deducida en *F. konzum*, a través de la metabolización de sustratos exógenos, es similar a la de *F. fujikuroi* existiendo una vía principal 3β hidroxilada predominante que difiere en el producto final principal (GA<sub>1</sub> en vez de GA<sub>3</sub>) (Fig. 6). La hidroxilación en 3β ocurriría a nivel del GA<sub>12</sub> aldehído, ya que al incubar con <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> no se observan productos 3β-hidroxilados. Aun cuando la vía 3β-hidroxilada es la más importante, se forman productos no hidroxilados, lo que sugiere una alteración de la relación entre las actividades 3β-hidroxilasa/7-oxidasa de la GA<sub>14</sub> sintasa en *F. konzum*, actividades que determinan la ramificación de la vía a nivel del GA<sub>12</sub> aldehído. La actividad de

3 $\beta$ -hidroxilasa no sería tan eficiente como en *F. fujikuroi* con respecto a la oxidación en C7, lo que explicaría la mayor participación de la vía no hidroxilada.

Al comparar la velocidad de la reacción de oxidación en C7 del ácido entkaurenoico en la cepa I<sub>3</sub> con la cepa ACC917 de *F. fujikuroi*, se encontró que es 397 veces más rápida en la última. Con respecto a la oxidación del metilo 20 no se detectó con la cepa I<sub>3</sub> productos alcohol o aldehído hidroxilados en 3 $\beta$  a diferencia de la metabolización de <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> que generó <sup>14</sup>C-GA<sub>15</sub> (C20 alcohol) y <sup>14</sup>C-GA<sub>24</sub> (C20 aldehído), además de <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub>, resultante de la oxidación hasta CO<sub>2</sub> del C20. Esto indica que la C20 oxidasa utiliza de manera eficiente al intermediario 3 $\beta$ -hidroxilado (<sup>14</sup>C-GA<sub>14</sub>), mientras que <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> es utilizado con una menor eficiencia formándose productos parcialmente oxidados que se acumulan en el medio de cultivo. La velocidad de utilización de <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub>, que es 216 veces menor con la cepa I<sub>3</sub> que con la cepa ACC917, confirma esta hipótesis. En mutantes de *F. fujikuroi* que carecen de P450 reductasa, en las que la C20 oxidasa presenta baja actividad se generan también GAs C20 alcohol y C20 aldehído (Troncoso et al, 2008).

La reacción de hidroxilación en C13 fue investigada con los sustratos lactónicos <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> (no hidroxilado) y <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> (3-hidroxilado). El precursor <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> fue transformado en <sup>14</sup>C-GA<sub>20</sub> con una velocidad 62 veces menor en la cepa I<sub>3</sub> que en la cepa ACC917. Aunque <sup>14</sup>C-GA<sub>4</sub> fue utilizado con mayor eficiencia que <sup>14</sup>C-GA<sub>9</sub> por la cepa I<sub>3</sub>, su velocidad de conversión fue 48 veces más rápida en la cepa ACC917. En *F. konzum* la reacción más lenta de la secuencia es la desaturación como lo indica la formación de GA<sub>1</sub> como producto principal, formado por hidroxilación en C13 del GA<sub>4</sub>. Se descartó que GA<sub>1</sub> se genere también desde GA<sub>20</sub> a través de la vía no hidroxilada, ya que <sup>14</sup>C-GA<sub>20</sub> exógeno no fue metabolizado por los cultivos.

Al ensayar la GA<sub>14</sub> sintasa con <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> aldehído en microsomas obtenidos del micelio de I<sub>3</sub>, se observó que éstos son menos activos que los microsomas de *F. fujikuroi*. El producto principal corresponde a <sup>14</sup>C-GA<sub>12</sub> (no hidroxilado) junto a una menor cantidad del producto 3 $\beta$ -hidroxilado, <sup>14</sup>C-GA<sub>14</sub>. Esto podría deberse a una pérdida selectiva de la actividad de 3 $\beta$ -hidroxilasa durante la preparación de

los microsomas. Las reacciones observadas con  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>12</sub> aldehído requieren NADPH y son activadas por FAD, lo que indica la existencia de la citocromo P450 reductasa en *F. konzum*, que estaría asociada a la GA<sub>14</sub> sintasa. Los ensayos en presencia de NADH no mostraron transformación de este sustrato, por lo que el sistema del citocromo b<sub>5</sub> no participaría en la biosíntesis de GAs en esta especie de *Fusarium* (Troncoso et al., 2008).

Las diferencias observadas en la biosíntesis de GAs entre ambas especies podrían deberse a alteraciones en los genes y/o en su expresión, atribuibles al mecanismo de regulación. El hecho de encontrar reducidas todas las reacciones de monooxigenasas sugiere que habría algún factor común que las afecta, ya que es poco probable que todos los genes presenten mutaciones. Este factor podría ser el mecanismo de inducción en ausencia de nitrógeno, que se encontró disminuido en la cepa I<sub>3</sub>. La 13-hidroxilasa, que no presenta represión por nitrógeno, no se vería afectada en *F. konzum* y a diferencia de las otras oxidadas, tendría una actividad mayor.

Además de la comparación con *F. fujikuroi*, la caracterización de las enzimas y de las reacciones de la biosíntesis de GAs en *F. konzum* permitió comparar la funcionalidad de las oxidadas de GAs con las de la especie no productora *F. proliferatum* (Malonek et al., 2005a y b). En esta especie, aislada del maíz, la GA<sub>14</sub> sintasa es activa aunque presenta una baja eficiencia al igual que en *F. konzum*. La desaturasa también tiene una eficiencia reducida en *F. proliferatum*, obteniéndose  $^{14}\text{C}$ -GA<sub>1</sub> a partir del ácido *ent*- $^{14}\text{C}$ -kaurenoico (Malonek et al., 2005a). Es posible que en *F. proliferatum* esté también alterado el mecanismo de regulación por nitrógeno, ya que se ha demostrado que todos los genes de GAs presentan una expresión muy baja (Malonek et al., 2005a). A diferencia de *F. konzum*, esta especie presenta mutaciones en los genes de la GGDP sintasa y la *ent*-kaureno sintasa, que generan proteínas inactivas bloqueando la vía de síntesis de GAs en las etapas tempranas (Malonek et al., 2005b).

El GA<sub>1</sub> es una de las 4 giberelinas, junto con GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> y GA<sub>7</sub>, que tienen efecto fisiológico sobre las plantas (Tudzynski, 1999a). Esta GA presenta diferentes actividades como fitohormona que el GA<sub>3</sub> que sintetiza *F. fujikuroi*, y se

produce en muy baja concentración en los cultivos de esta última especie. Las cepas productoras de GAs de *F. konzum* sintetizan GA<sub>1</sub> como producto principal, lo que podría tener importancia económica, por la posibilidad de producir esta GA en forma comercial, y con un buen grado de pureza. Aunque los resultados obtenidos muestran que *F. konzum* produce bajos niveles de GA<sub>1</sub>, es factible mejorar las condiciones de cultivo, u obtener cepas de *F. konzum* que sean mas eficientes en la producción de GAs, tanto por mejoramiento genético como por métodos de selección.

El hecho de que *F. konzum* sea la única especie del complejo capaz de producir GAs además de *F. fujikuroi*, aun cuando todas poseen los genes respectivos, sugiere que la capacidad de producir GAs se ha perdido en algunas especies del complejo a través de la evolución. Aunque el rol funcional de las GAs en *F. fujikuroi* o en *F. konzum* no ha sido estudiado sistemáticamente, estos diterpenos podrían contribuir a la patogenicidad como en el caso de *F. fujikuroi* o bien podrían participar en otros aspectos de la relación del hongo con la planta hospedera. Probablemente la capacidad de producir GAs se ha perdido en aquellas especies del complejo en las que las GAs no representan una ventaja evolutiva, especies en que mutaciones que inactivan las enzimas no alterarían la interacción del hongo con la planta. En el caso de *F. konzum* no se ha observado una alteración del crecimiento en los pastos en los que crece (Zeller et al. 2003) sin embargo, no se puede descartar que las GAs que sintetiza este hongo participen en otros aspectos del metabolismo de la planta que se relacionen con su interacción con el hongo.

## 5. Conclusiones

- La capacidad de sintetizar GAs varía en distintas cepas de *F. konzum*, existiendo cepas productoras y no productoras.
- En las cepas productoras de GAs de *F. konzum* el producto principal es la GA lactónica 3 $\beta$ ,13 hidroxilada GA<sub>1</sub>, en vez de GA<sub>3</sub> que es el producto principal en *F. fujikuroi*. Los cultivos de *F. konzum* sintetizan la giberelina lactónica 13-hidroxilada GA<sub>20</sub>, aunque en baja cantidad lo que indica la participación de la vía no hidroxilada en esta especie.
- La vía 3 $\beta$ -hidroxilada que forma GA<sub>1</sub> a través de los intermediarios GA<sub>14</sub> y GA<sub>4</sub> es la principal, como se demostró con el precursor temprano ácido *ent*-<sup>14</sup>C-kaurenoico.
- En la vía menor no hidroxilada se acumulan productos de oxidación del C20 (alcohol, aldehído) además del producto de oxidación hasta CO<sub>2</sub> GA<sub>9</sub>, debido a una baja eficiencia de la C20 oxidasa.
- La metabolización de precursores exógenos es más eficiente a pH 2,7 que a pH 4,0 probablemente debido a la protonación de los sustratos que afectaría el ingreso al micelio.
- El NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> presente en el medio de cultivo no afecta la velocidad de síntesis de GAs de manera significativa, a diferencia de lo que sucede en *F. fujikuroi*. Las reacciones son lentas en ausencia o presencia de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.
- Las reacciones catalizadas por la GA<sub>14</sub> sintasa, la C20 oxidasa y la 13-hidroxilasa son más lentas en la cepa I<sub>3</sub> (*F. konzum*) que en la cepa ACC917 (*F. fujikuroi*) en 397, 216 y 48 veces, respectivamente. La reacción más lenta de la secuencia biosintética es la reacción de desaturación del GA<sub>4</sub>.
- La citocromo P450 reductasa, que requiere NADPH y FAD, es la proteína transportadora de electrones asociada a la GA<sub>14</sub> sintasa y probablemente a las otras monooxigenasas de GAs en *F. konzum*.

- La baja actividad de las oxidasas de GAs en *F. konzum*, se debería a que el mecanismo de regulación de la biosíntesis de GAs, la inducción de las enzimas en ausencia de nitrógeno, es muy ineficiente.



## 6. REFERENCIAS

- Bearder, J.R.**, MacMillan, J., Phinney, B.O. (1975) "Fungal products. Part XIV. Metabolic pathways from ent-kaurenoic acid to the fungal gibberellins in mutant B1-41a of *Gibberella fujikuroi*". J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 721-26.
- Cross, B.E.**, Galt, R.H.B., Norton, K. (1968) "The biosynthesis of gibberellins-II". Tetrahedron 24, 231-37.
- Donaldson, R.P.**, Luster, D.G. (1991) "Multiple Forms of Plant Cytochromes P-450". Plant Physiol. 96(3), 669-674.
- Edebo, L.** (1983) "Desintegration of cells by extrusion under pressure. In: Lafferty, R.M. (Ed.) Enzyme Technology. Springer Verlag. Berlin.
- Fall, R.R.**, West, C.A., (1971) "Purification and properties of kaurene synthetase from *Fusarium moniliforme*". J. Biol. Chem. 246, 6913.
- Gaskin, P.**, MacMillan, J. (1991) "GC/MS of gibberellins and related compounds: methodology and a library of reference spectra". Cantocks Enterprises, Ltd. University of Bristol, U.K..
- Geissman, T.A.**, Verbiscar, A.J., Phinney, B.O., Cragg, G. (1966) "Studies on the biosynthesis of gibberellins from (-)kaurenoic acid in cultures of *Gibberella fujikuroi*". Phytochemistry 5, 933-47.
- Graebe, J.E.**, Hedden, P., Gaskin, P., MacMillan, J. (1974) "Biosynthesis of the gibberellins A12, A15, A24, A36 and A37 by a cell free system from *Cucurbita maxima*". Phytochem. 13, 1344.
- Graebe, J.E.** (1987) "Gibberellin biosynthesis and control". Ann. Rev. Plant Physiol. 38, 419-65.
- Hedden, P.** (1978) "The metabolism of the gibberellins". Ann. Rev. Plant Physiol. 29, 149-92.
- Hedden, P.**, Phillips, A.L. (2000) "Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes". Trends Plant Sci. 5(12), 523-30.
- Hedden, P.**, Phillips, A.L., Rojas, M.C., Carrera, E., Tudzynski, B. (2002) "Gibberellin Biosynthesis in Plants and Fungi: A Case of Convergent Evolution?". J. Plant Growth Regul. 20(4):319-331.
- Hori, S.** (1898) "Some observations on "bakanae" disease of the rice plant". Men. Agric. Res. Sta. Tokyo 12, 110.

**Jennings, J.C.,** Coolbaugh, R.C., Nakata, D.A., West, C.A. (1993) "Characterization and solubilization of kaurenoic acid hydroxylase from *Gibberella fujikuroi*". Plant Physiol. 101, 925.

**Kerényi, Z.,** Zeller, K., Hornok, L., Leslie, J.F. (1999) "Molecular standardization of mating type terminology in the *Gibberella fujikuroi* species complex". Appl. Environ. Microbiol. 65(9), 4071-6.

**Leslie, J.F.,** Plattner, R.D., Desjardins, A.E., Klittich, C.J.R. (1992) "Fumonisin B[1] production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (Fusarium section Liseola)". Phytopathology 82(3), 341-45.

**Leslie, J.F.,** Zeller, K.A., Logrieco A., Mulè G., Moretti A., Ritieni A. (2004) "Species diversity of and toxin production by *Gibberella fujikuroi* species complex strains isolated from native prairie grasses in Kansas" Appl. Environ. Microbiol. 70(4), 2254-2262.

**Linnemannstöns, P.,** Voss, T., Hedden, P., Gaskin, P., Tudzynski, B. (1999) "Deletions in the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi* by restriction enzyme-mediated integration and conventional transformation-mediated mutagenesis". Appl Environ Microbiol. 65(6), 2558-64.

**MacMillan, J.**(1997a) "Biosynthesis of the gibberellin plant hormones". Nat. Prod. Rep. 14, 221-244.

**MacMillan, J.,** Ward, D.A., Phillips, A.L., Sánchez-Beltrán, M.J., Gaskin, P., Lange, T., Hedden, P. (1997b) "Gibberellin biosynthesis from gibberellin A12-aldehyde in endosperm and embryos of *Marah macrocarpus*". Plant. Physiol. Apr; 113(4), 1369-77.

**Malonek, S.,** Rojas, M.C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P., Tudzynski, B. (2004) "The NADPH-cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis". J. Biol. Chem. 279(24), 25075-84.

**Malonek, S.,** Rojas, M.C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P., Tudzynski, B. (2005a) "Functional characterization of two cytochrome P450 monooxygenase genes, P450-1 and P450-4, of the gibberellic acid gene cluster in *Fusarium proliferatum* (*Gibberella fujikuroi* MP-D)". Appl. Environ. Microbiol. 71(3), 1462-72.

**Malonek, S.,** Rojas, M.C., Hedden, P., Hopkins, P., Tudzynski, B. (2005b) "Restoration of gibberellin production in *Fusarium proliferatum* by functional complementation of enzymatic blocks". Appl. Environ. Microbiol. 71(10), 6014-25.

**Malonek, S.,** Bömke, C., Bornberg-Bauer, E., Rojas, M.C., Hedden, P., Hopkins, P., Tudzynski, B. (2005c) "Distribution of gibberellin biosynthetic genes and

gibberellin production in the *Gibberella fujikuroi* species complex". *Phytochemistry* 66(11), 1296-311.

**Mihlan, M.**, Homann, V., Liu, T.W., Tudzynski, B. (2003) "AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR". *Mol. Microbiol.* 47(4), 975-91.

**Rademacher, W.** (1992) "Inhibition of Gibberellin Production in the Fungi *Gibberella fujikuroi* and *Sphaceloma manihoticola* by Plant Growth Retardants". *Plant Physiol.* 100(2), 625-629.

**Rojas, M.C.**, Hedden, P., Gaskin, P., Tudzynski, B. (2001) "The P450-1 gene of *Gibberella fujikuroi* encodes a multifunctional enzyme in gibberellin biosynthesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(10), 5838-43.

**Rojas, M.C.**, Urrutia, O., Cruz, C., Gaskin, P., Tudzynski, B., Hedden, P. (2004) "Kaurenolides and fujenoic acids are side products of the gibberellin P450-1 monooxygenase in *Gibberella fujikuroi*". *Phytochemistry* 65(7), 821-30.

**Teichert, S.**, Wottawa, M., Schönig, B., Tudzynski, B. (2006) "Role of the *Fusarium fujikuroi* TOR kinase in nitrogen regulation and secondary metabolism". *Eukaryot. Cell.* 5(10), 1807-19.

**Troncoso, C.**, Cárcamo, J., Hedden, P., Tudzynski, B., Rojas, M.C. (2008) "Influence of electron transport proteins on the reactions catalyzed by *Fusarium fujikuroi* gibberellin monooxygenases". *Phytochemistry* 69(3), 672-83.

**Tudzynski, B.**, Hölter, K. (1998) "Gibberellin biosynthetic pathway in *Gibberella fujikuroi*: evidence for a gene cluster". *Fungal Genet. Biol.* 25(3), 157-70.

**Tudzynski, B.** (1999a) "Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52(3), 298-310.

**Tudzynski, B.**, Homann, V., Feng, B., Marzluf, G.A. (1999b) "Isolation, characterization and disruption of the *areA* nitrogen regulatory gene of *Gibberella fujikuroi*". *Mol. Gen. Genet.* 261(1), 106-14.

**Tudzynski, B.**, Hedden, P., Carrera, E., Gaskin, P. (2001) "The P450-4 gene of *Gibberella fujikuroi* encodes ent-kaurene oxidase in the gibberellin biosynthesis pathway". *Appl. Environ. Microbiol.* 67(8), 3514-22.

**Tudzynski, B.**, Rojas, M.C., Gaskin, P., Hedden, P. (2002) "The gibberellin 20-oxidase of *Gibberella fujikuroi* is a multifunctional monooxygenase". *J. Biol. Chem.* 277(24), 21246-53.

**Tudzynski, B.,** Mihlan, M., Rojas, M.C., Linnemannstons, P., Gaskin, P., Hedden, P. (2003) "Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi*: des and P450-3 encode GA<sub>4</sub> desaturase and the 13-hydroxylase, respectively". *J. Biol. Chem.* 278(31), 28635-43.

**Tudzynski, B.** (2005) "Gibberellin biosynthesis in fungi: genes, enzymes, evolution, and impact on biotechnology". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66(6), 597-611.

**Urrutia, O.,** Hedden, P., Rojas, M.C. (2001) "Monooxygenases involved in GA12 and GA14 synthesis in *Gibberella fujikuroi*". *Phytochemistry* 56(5), 505-11.

**Zeller, K.A.,** Summerell, B.A., Bullock, S., Leslie, J.F. (2003) "*Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex". *Mycologia* 95, 943-45